Isolierung hydroxylierter Steroide aus Blutplasma und Identifizierung mit der Kombination Glaskapillargaschromatographie - Massenspektrometrie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Helga Ludwig
aus Göttingen

Göttingen 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534923_0018

ISOLIERUNG HYDROXYLIERTER STEROIDE AUS BLUTPLASMA UND IDENTIFIZIERUNG MIT DER KOMBINATION GLASKAPILLARGASCHROMATOGRAPHIE-MASSENSPEKTROMETRIE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Helga Ludwig
aus Göttingen

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Professor Dr. G. Spiteller

Korreferent: Professor Dr. W. Lüttke

Tag der mündlichen Prüfung: 1. 7. 1976

Meinen Eltern gewidmet

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden vom Februar 1973 bis April 1976 am Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Spiteller durchgeführt

Mein besonderer Dank gilt meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. Spiteller, für die Anregung zu diesem Thema, für sein stetes Interesse und seine Bereitschaft, die mit dieser Arbeit verbundenen Probleme zu diskutieren

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

		Seite
I.	Einleitung	1
	Theoretischer Teil	
II.	Problemstellung	3
III.	Literaturübersicht	8
	1. Tabelle der Blutsteroide	9
	2. Tabelle der Liquorsteroide	28
IV.	Beschreibung des Aufarbeitungsverfahrens	31
	1. Kontrolle des Aufarbeitungsverfahrens	33
	2. Trennungsgang der Steroidsulfate	35
	2.1 Abtrennung des Eiweißes an XAD-4	36
	2.2 Trennung an Sephadex-LH-20	38
	2.3 Verseifung und Extraktion	41
	2.4 Trennung an DEAP-LH-20	43
	2.5 Trennung an Lipidex^{R}-5000	45
	2.6 Reinigung an Kieselgel	47
	2.7 Derivatisierung	48
	2.8 Übersicht und Resultat der Aufarbeitungskontrolle für den Trennungsgang der Sulfate	49
	3. Trennungsgang der Glucuronide	50
	4. Trennungsgang der proteingebundenen Steroide	52
V.	Ergebnis und Diskussion	58
	1. Biosynthese der Steroide	58
	2. Anmerkung zur Auswertung der Glaskapillargaschromatogramme und Massenspektren	62

Seite

3. Glaskapillargaschromatogramme der einzelnen Fraktionen und Interpretation der Massenspektren 65

3.1 Monosulfatfraktionen 66

3.2 Disulfatfraktionen 104

3.3 Sauer verseifte Sulfate 113

3.4 Übrige Steroidsulfate 116

3.5 Glucuronidfraktionen 119

3.6 Fraktion der unkonjugierten Steroide 121

3.7 Steroide aus Liquor cerebrospinalis 124

3.8 Zusammenstellung der Steroide, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurden (Tabelle) 126

VI. Zusammenfassung 130

Experimenteller Teil 133

A Verwendete Geräte 133

1. Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kombinationen 133

2. Gaschromatograph 133

3. Szintillationszähler 134

B Isolierung der Steroide aus Blutplasma 134

1. Steroidsulfate 134

2. Steroidglucuronide 136

2.1 Aufarbeitung A 136

2.2 Aufarbeitung B 137

3. Proteingebundene Steroide 137

3.1 Aufarbeitung A 137

3.2 Aufarbeitung B 138

3.3 Aufarbeitung C 138

Seite

C Isolierung der Steroide aus Liquor cerebrospinalis 138

1. 1. Aufarbeitung 138

2. 2. Aufarbeitung 139

D Herstellung der Steroidtrimethylsilylether 139

E Trennversuche mit Testgemischen an Säulen 140

1. Sephadex-LH-20 A 140

2. DEAP-LH-20 141

3. Lipidex^{R}-5000 141

4. Sephadex-LH-20 B 141

F Überprüfung des Aufarbeitungsverfahrens mit [7-^{3}H] Dehydroepiandrosteron mit der Tracer-Methode 142

G Herstellung von 3ß,17α,20α-Trihydroxy-5α-pregnan 143

H Bestimmung der Retentionsindices 143

1. Retentionsindices von Steroidtrimethylsilylethern 145

Literaturverzeichnis 146

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Seite

1. Gaschromatogramme

Abb.:

Monosulfatfraktionen aus:

15 a+b 180 ml Plasma eines Mannes 66

24 a+b 1 l Plasma (Pool) 74

33 40 ml Plasma einer Frau 91

35 250 ml Plasma eines Mannes 93

36 250 ml Plasma eines Mannes 94

38 250 ml Plasma einer Frau 96

43 100 ml Plasma einer Frau 101

Disulfatfraktionen aus:

45 250 ml Plasma eines Mannes 104

46 180 ml Plasma eines Mannes 105

47 40 ml Plasma einer Frau 106

48 100 ml Plasma einer Frau 107

Sauer verseifte Steroidsulfate aus:

53 250 ml Plasma eines Mannes 113

55 180 ml Plasma eines Mannes 115

Glucuronidfraktion aus:

58 250 ml Plasma einer Frau 120

Unkonjugierte Steroide aus:

59 180 ml Plasma eines Mannes 122

Liquorsteroidsulfatfraktion aus:

62 300 ml Sammelliquor 125

2. Massenspektren der Trimethylsilylether:

Abb.:	Steroide	Seite
16	3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-on	69
17	3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on	70
18	3ß-Hydroxy-5α-androstan-17-on	71
19	3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten	72
20	3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-on	73
21	3ß,16α-Dihydroxy-5-androsten-17-on	74
22	3ß,20α-Dihydroxy-5-pregnen	75
23 a	3ß,17α,20α-Trihydroxy-5-pregnen	76
23 b	3ß,17α,20α-Trihydroxy-5-pregnen	78
25 a	3α-Hydroxy-5-androsten-17-on (aus Blut)	81
25 b	3α-Hydroxy-5-androsten-17-on (Referenzsubstanz)	82
26	3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on	83
27	3ß,17ß-Dihydroxy-5α-androstan	84
28	3,16,17-Trihydroxyandrostan	85
29	3ß,16α,17ß-Trihydroxy-5-androsten	87
30	3,16,20-Trihydroxy-5-pregnen	88
31	3ß,17α,20α-Trihydroxy-pregnan	89
32	6(?),20-Dihydroxy-4-pregnen-3-on	90
34	3ß-Hydroxy-5α-androstan-11,17-dion	92
37	20α-Hydroxy-4-pregnen-3-on	95
39	3,7-Dihydroxy-5-androsten-17-on	97
40	3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion	98
41	3,20-Dihydroxypregnan	98

Abb.:	Steroide	Seite
42	20α-Hydroxy-5α-pregnan-3-on	100
49	3,7,17-Trihydroxy-5-androsten	109
50	6,17-Dihydroxy-4-androsten-3-on	110
51	Dihydroxyandrostanon	111
52	3,17-Dihydroxy-5-androsten-7-on	112
54	3ß,16α-Dihydroxy-5-pregnen-20-on	114
56	3α,17α,21-Trihydroxy-5ß-pregnan-11,20-dion	117
57	24-Ethyl-3ß-hydroxy-5-cholesten	118
60	11α-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion	123
61	11(?),20-Dihydroxy-pregnan-3-on	124

I. EINLEITUNG

Die Untersuchung komplexer Stoffgemische wie Körperflüssigkeiten erfordert Analysenmethoden, die eine hervorragende Trennung und eine sichere Erfassung der Einzelkomponenten erlauben. Eine schnell und empfindlich arbeitende Analysenmethode ist die Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Der Vorteil der Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie liegt darin, daß der Substanzbedarf zur Erfassung einer Komponente sehr gering ist: Beispielsweise beträgt er für Steroide 20 bis 100 ng je nach Gerätekombination. Andererseits lassen sich auch aus Spektren nicht ganz reiner Verbindungen Rückschlüsse auf deren Struktur ziehen. Voraussetzung für die Anwendungsmöglichkeit dieser Analysenmethode ist allerdings, daß die Verbindungsklasse flüchtig ist oder durch Derivatisierung in flüchtige Verbindungen überführt werden kann.

Kombiniert man die Massenspektrometrie mit der Glaskapillarsäulengaschromatographie, einer relativ neuen Analysentechnik[1-3], kann eine zusätzliche Empfindlichkeitssteigerung der Trennleistung erzielt werden, so daß auch noch kleinste Mengen einer Verbindung - bei Steroiden circa 20 ng - identifiziert werden können.

Grundlagenarbeiten auf diesen Gebieten wurden von unserer Arbeitsgruppe schon seit Jahren ausgeführt: Abbaureaktionen von Steroiden im Massenspektrometer wurden untersucht, Vergleichsverbindungen synthetisiert und eine Spektrensammlung angelegt[4-9]. Chromatographische Verfahren werden routinemäßig zur Trennung biologischer Gemische eingesetzt[10-14] und geeignete Glaskapillarsäulen wurden produziert[15].

Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte sein, die praktische Verwendbarkeit der erarbeiteten Verfahren bei der Untersuchung von Steroiden aus biologischem Material, in diesem Fall aus Blut, zu beweisen.

II. THEORETISCHER TEIL

Problemstellung

Blutplasma ist eine komplexe Lösung, die vorzugsweise Fett, Eiweiß und Cholesterin enthält. Im Vergleich zu der Cholesterinmenge, die durchschnittlich 170 mg/100 ml Plasma beträgt[16], ist der Gehalt an anderen Steroiden sehr gering. In 100 ml Plasma findet man 250 /ug Steroide, von denen die Hauptmenge das 3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on (Dehydroepiandrosteron) mit durchschnittlich 150 /ug/100 ml Plasma ist[17-19].

Während der Schwangerschaft steigt die Konzentration der Gesamtsteroide an. In 100 ml Plasma wurde bei Schwangerschaft bis zu 300 /ug eines Steroides gefunden[20-22].

Die Steroide im Blut kommen frei, als Sulfate, Glucuronide, Fettsäureester und Steroid-Proteinkomplexe vor. Von den Konjugaten liegen Pregnane und Androstane größtenteils als Sulfate, Cholestane meist als Glucuronide und Fettsäureester vor. Außerdem sind Cholestane, Androstane und Pregnane - hauptsächlich die Corticosteroide - an Proteine wie Albumin und Globulin gebunden[23,24].

Diese Steroide, die zum Teil hohe physiologische Wirksamkeit entfalten, sind wegen ihrer kleinen Konzentration nur schwer von Cholesterin, dessen Gehalt im Blutplasma tausend-

mal höher ist, Fetten, freien Fettsäuren, Zuckern, anorganischen Salzen, kleinen organischen Molekülen und vor allem vom Eiweiß, dessen Gewicht circa 20 g/100 ml Plasma beträgt, abzutrennen.

Es ist notwendig, ein Aufarbeitungsverfahren zu entwickeln oder aus der Literatur zu übernehmen, das erlaubt, möglichst alle Begleitstoffe der Blutsteroide zu entfernen und die Steroide nicht in Artefakte überführt.

In einem solchen Aufarbeitungsverfahren müssen effektive Trennschritte kombiniert werden, wobei jeder wenigstens eine Stoffklasse von den Steroiden quantitativ abtrennt.

Die Methode muß so gut ausgearbeitet werden, daß auch mit 20 ml Blut (entsprechend 10 ml Plasma) noch brauchbare Ergebnisse erzielt werden können, um zu ermöglichen, daß später Blutproben von Patienten mit Steroidstoffwechselstörungen untersucht werden können.

Unter diesem Aspekt sollte die Aufarbeitung reproduzierbar sein: Werden Blutproben der gleichen Herkunft untersucht, sollten die erhaltenen Steroidgemische nahezu identisch sein, denn sonst kann man bei Steroidstoffwechselstörungen keine eindeutigen Schlußfolgerungen ziehen.

Da die Steroide unterschiedlich gebunden sind, ist es schwierig, sie alle in einem Trennungsgang zu erfassen. Außerdem ist es von Interesse, die Bindungsart der Steroide im Verhältnis zu ihrer Menge festzustellen. Aus diesem Grund sollen Sulfate, Glucuronide und proteingebundene Steroide unabhängig voneinander isoliert und analysiert werden.

Sollten diese Forderungen - Abtrennung des isolierten Steroidgemisches von Beimengungen anderer Stoffe im Zuge eines schonenden reproduzierbaren Aufarbeitungsverfahrens - erfüllt werden, muß es möglich sein, aus anderen komplexen Körperflüssigkeiten gleicher qualitativer Zusammensetzung wie Blutplasma Steroide zu isolieren und zu analysieren, wie z.B. aus Liquor, in dem jedoch noch eine geringere Steroidkonzentration vorhanden ist.

Verschiedene Methoden wie Radioimmunoassaymessungen, Gas-, Dünnschicht- und Papierchromatographie bleiben im allgemeinen darauf beschränkt, bekannte Verbindungen quantitativ zu bestimmen, dagegen läßt die Kombination Massenspektrometrie-Gaschromatographie auch eine Identifizierung von unbekannten Blutsteroiden zu.

Eine besondere wirkungsvolle Trennmethode ist, wie einleitend erwähnt, die Glaskapillargaschromatographie. Mit dieser

Kombination sollte eine halbquantitative Erfassung der Blutsteroide gelingen, die als Profile dargestellt werden sollen. Gleichzeitig lassen sich bisher unbekannte Blutsteroide massenspektrometrisch nachweisen.

Da freie Steroide Glaskapillarsäulen nicht unzersetzt passieren können, müssen sie in flüchtige Derivate überführt werden, die massenspektrometrisch gut identifizierbar, gaschromatographisch trennbar und bei nahezu vollständiger Umsetzung leicht herzustellen sein sollten.

Als Derivate eignen sich die Trimethylsilylether. Die Molekulargewichte der Steroidtrimethylsilylether liegen in einem gut faßbaren Bereich von 300 bis 700 und die Umsetzung kann in annehmbaren Fehlergrenzen reproduzierbar gestaltet werden.

Die massenspektrometrische Analyse eines bestenfalls angereicherten Steroidgemisches wird nur wenig beeinflußt, sofern sich noch auswertbare Massenspektren erhalten lassen, aber die "Profile" werden durch Begleitstoffe der Steroide erheblich verfälscht. Daher ist es notwendig, von Begleitstoffen befreite Steroidgemische herzustellen.

Die Retentionszeiten und -indices von Steroidtrimethylsilylethern können an Glaskapillarsäulen exakt bestimmt

werden und tragen zur weiteren Identifizierungen von Steroiden bei. Auch in unserem Arbeitskreis werden diese gaschromatographischen Meßmethoden seit einigen Jahren angewendet[15]. Sie sind erforderlich, weil die Trimethylsilylether isomerer Steroide oft so ähnliche Massenspektren zeigen, daß eine eindeutige Strukturzuordnung mit dieser Methode allein nicht gelingt.

III. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

Im Blut sind bisher etwa 100 Steroide entdeckt worden. Die Steroide wurden mit den verschiedensten Methoden nachgewiesen und quantifiziert. Die gebräuchlichsten Identifizierungsmethoden sind Papier-[25-29], Dünnschicht-[30-34] und Gaschromatographie[35-38], Hochdrucksflüssigkeitschromatographie[40-43] und spektroskopische Methoden wie IR- und UV-Spektroskopie[40-43]. Zur quantitativen Bestimmung einzelner Steroide werden hauptsächlich Radioimmunoassaymessungen[18,44-46] eingesetzt.

Auch die Massenspektrometrie, kombiniert mit der Gaschromatographie, wurde zur Identifizierung von Steroiden im Blut verwendet[17,20-22,47-55]. Allerdings wurden bisher zur Trennung der Blutsteroide nur gepackte Säulen verwendet. Erst vor wenigen Monaten erschien eine Veröffentlichung[38], in der über eine Trennung von Blutsteroiden an Glaskapillarsäulen berichtet wurde. Die Steroide wurden jedoch massenspektrometrisch nicht nachgewiesen.

Liquorsteroide sind bisher weniger gut untersucht worden: Bis jetzt konnten im Liquor cerebrospinalis ungefähr 20 Steroide mit der Dünnschicht-[56,57], Papier-[56-58], der Gaschromatographie[59,60] und der Fluorometrie[61,62] nachgewiesen werden. Die Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie wurde zur Untersuchung der Liquorsteroide

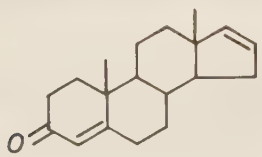
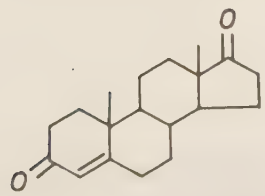
in unserem Arbeitskreis eingesetzt[63].

Die folgenden Tabellen zeigen eine Zusammenstellung der bisher in Blut und Liquor identifizierten Pregnane und Androstane. Auf die Zusammenstellung anderer Steroide - Cholestane und Östrane - wurde verzichtet, da in dieser Arbeit nur hydroxylierte Neutralsteroide mit Ausnahme der Cholestane untersucht wurden.

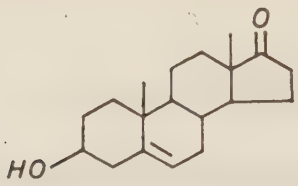
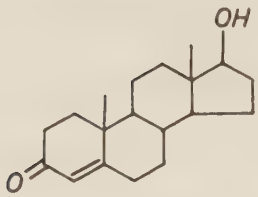
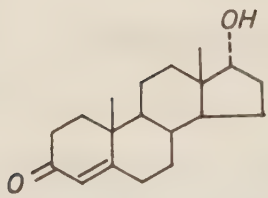
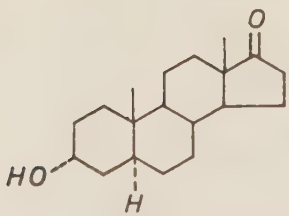
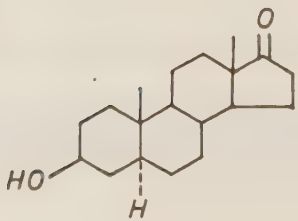
Tabelle 1

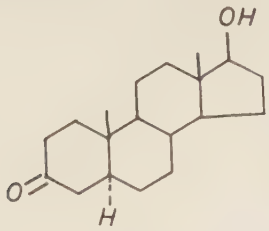
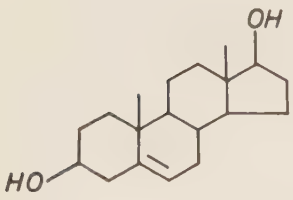
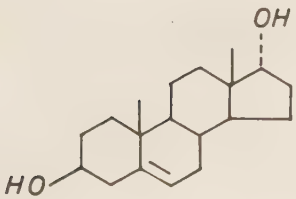
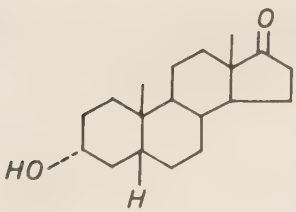
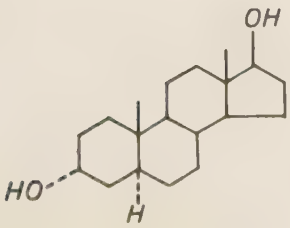
Im Blut identifizierte Androstane und Pregnane:

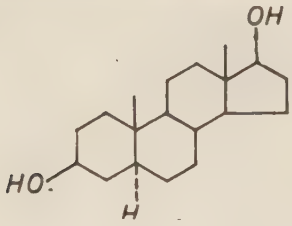
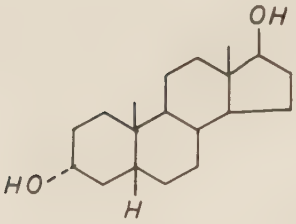
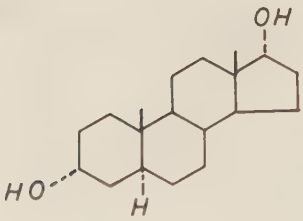
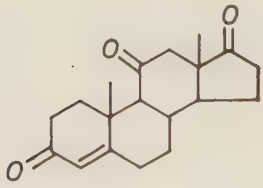
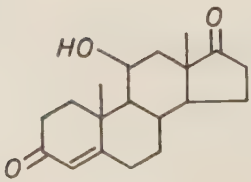
1.1 Androstane

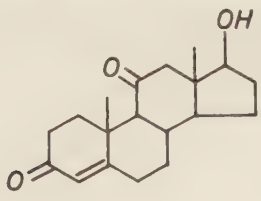
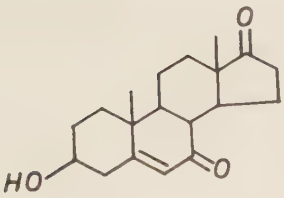
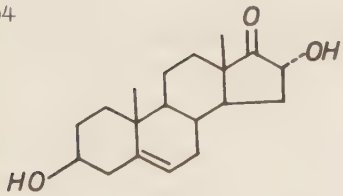
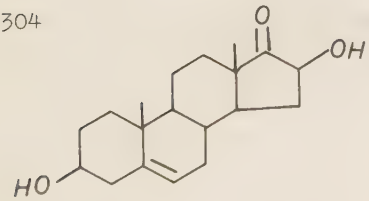
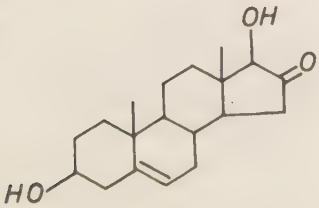
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.*
270 	4,16-Androstadien-3-on	64
286 	4-Androsten-3,17-dion	26,65

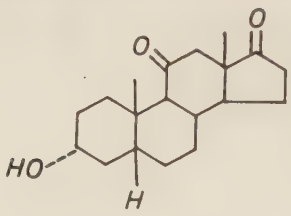
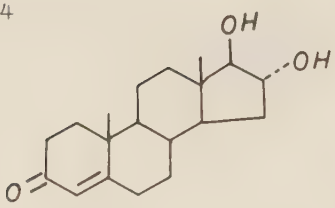
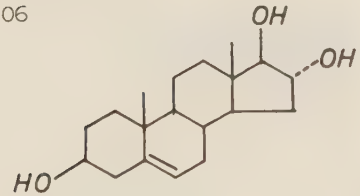
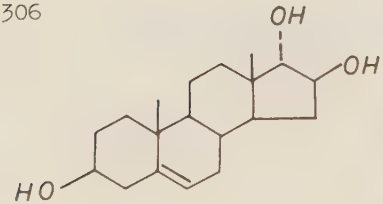
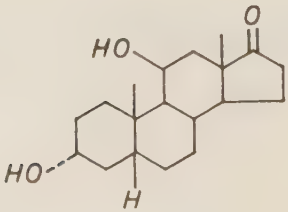
* Da über einige Steroide, wie Dehydroepiandrosteron oder Cortisol, ungefähr 100 Publikationen erschienen sind, können in diesen Fällen auch nur einige Veröffentlichungen zitiert werden.

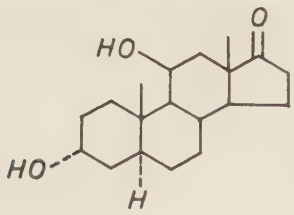
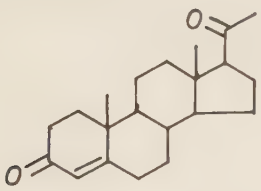
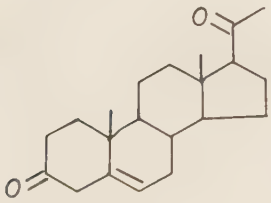
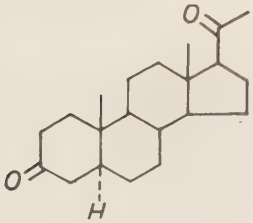
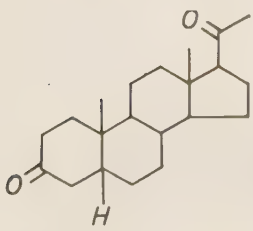
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
288 	3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on "Dehydroepiandrosteron"	27,35,50,51
288 	17ß-Hydroxy-4-androsten-3-on "Testosteron"	26,30,41,65
288 	17α-Hydroxy-4-androsten-3-on "Epitestosteron"	66
290 	3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on "Androsteron"	29,35,51,52
290 	3ß-Hydroxy-5α-androstan-17-on "Epiandrosteron"	19,52,67

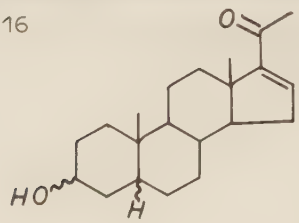
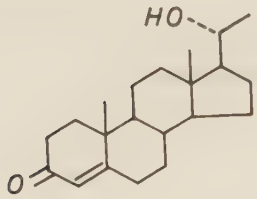
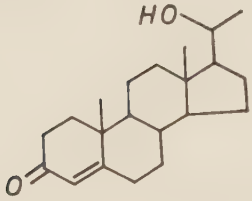
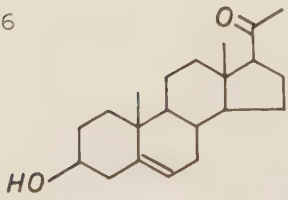
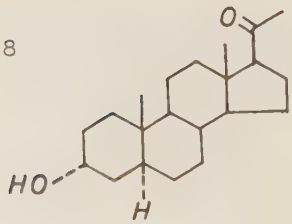
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
290 	17ß-Hydroxy-5α-androstan-3-on "Dihydrostestosteron"	68
290 	3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten	33,50,52, 67,70
290 	3ß-17α-Dihydroxy-5-androsten	33,50,67 70
290 	3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-on "Etiocholanolon"	29,52,69, 79
292 	3α,17ß-Dihydroxy-5α-androstan	22,67,70

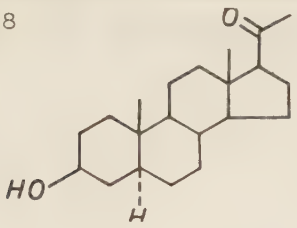
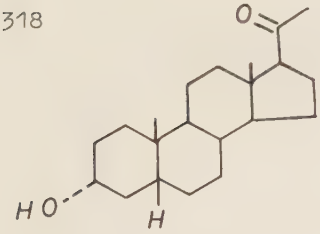
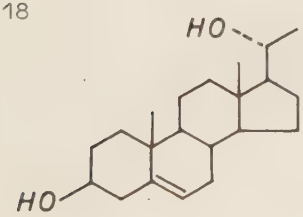
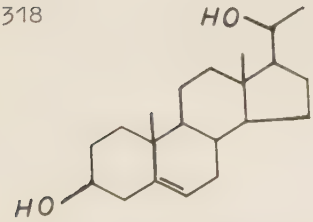
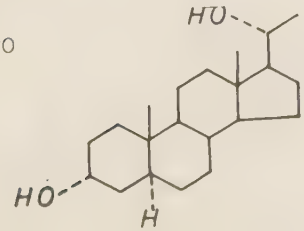
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
292 	3ß,17ß-Dihydroxy-5α-androstan	70
292 	3α,17ß-Dihydroxy-5ß-androstan	71
292 	3α,17α,Dihydroxy-5α-androstan	22
300 	4-Androsten-3,11,17-trion "Adrenosteron"	72,73
302 	11ß-Hydroxy-4-androsten-3,17-dion	69,74

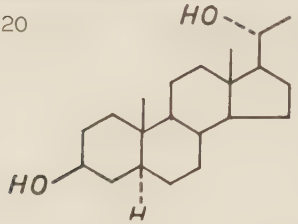
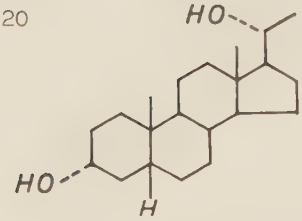
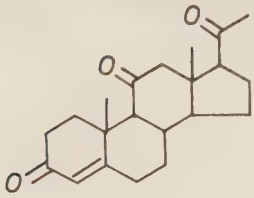
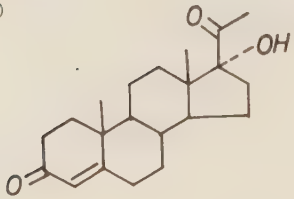
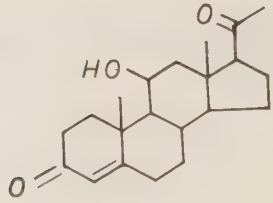
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
302 	17ß-Hydroxy-4-androsten-3,11-dion "11-Ketotestosteron"	72,73
302 	3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion "7-Ketodehydroepiandrosteron"	75,76
304 	3ß-16α-Dihydroxy-5-androsten-17-on "16α-Hydroxydehydroepiandrosteron"	22,28,33
304 	3ß,16ß-Dihydroxy-5-androsten-17-on	47
304 	3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten-16-on	33

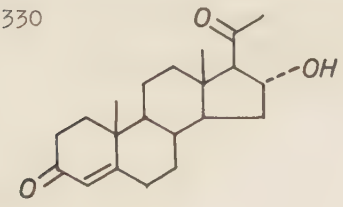
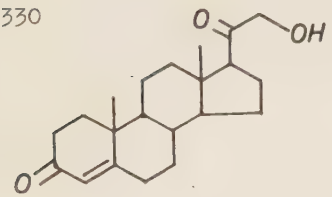
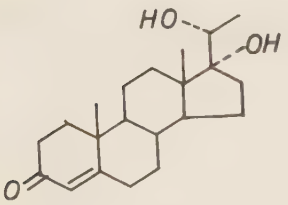
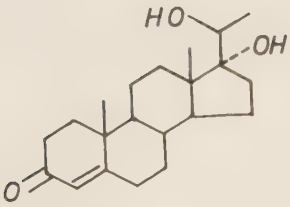
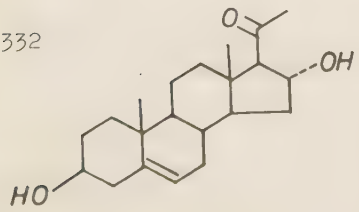
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
304 	3α-Hydroxy-5ß-androstan-11,17-dion "11-Ketoetiocholanolon"	77
304 	16α,17ß-Dihydroxy-4-androsten-3-on	78
306 	3ß,16α,17ß-Trihydroxy-5-androsten	33
306 	3ß,16ß,17α-Trihydroxy-5-androsten	47
306 	3α,11ß-Dihydroxy-5ß-androstan-17-on "11ß-Hydroxyetiocholanolon"	69,79,80

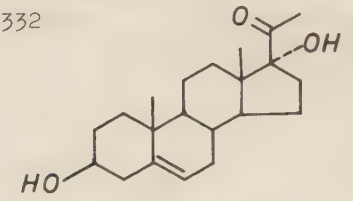
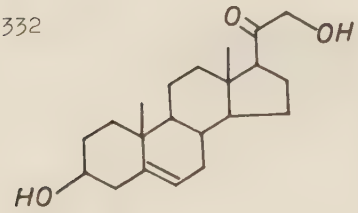
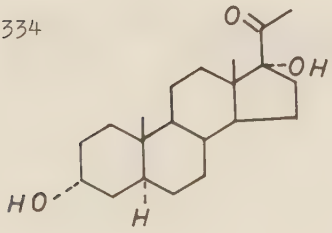
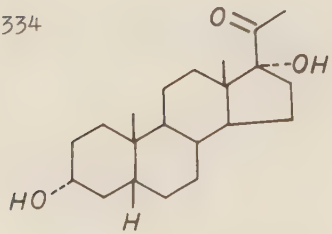
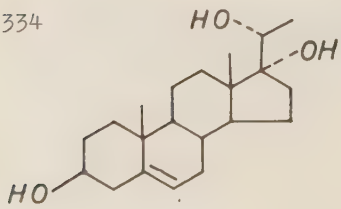
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
306 	3α,11ß-Dihydroxy-5α-androstan-17-on	80
1.2 Pregnane		
314 	4-Pregnen-3,20-dion "Progesteron"	41,74,79
314 	5-Pregnen-3,20-dion	81
316 	5α-Pregnan-3,20-dion	50
316 	5ß-Pregnan-3,20-dion	50

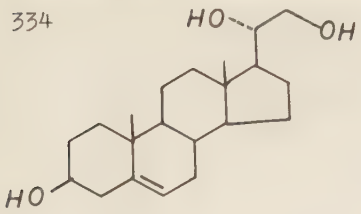
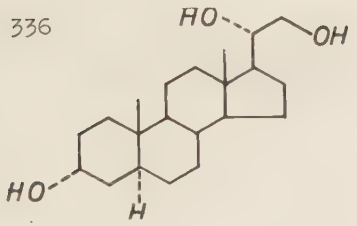
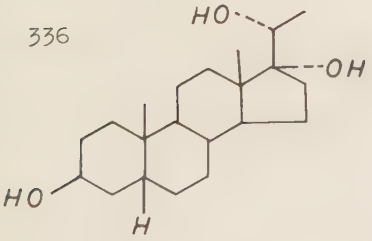
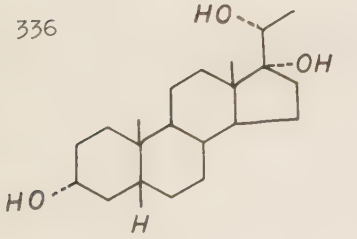
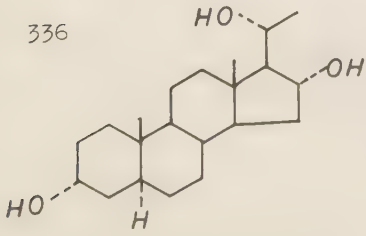
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
316 	3ξ-Hydroxy-5ξ-pregn-16-en-20-on	22
316 	20α-Hydroxy-4-pregnen-3-on	41,74
316 	20ß-Hydroxy-4-pregnen-3-on	41,74
316 	3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-on "Pregnenolon"	29,30,50, 67,70,79
318 	3α-Hydroxy-5α-pregnan-20-on	50

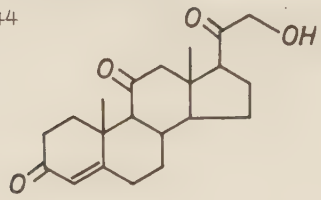
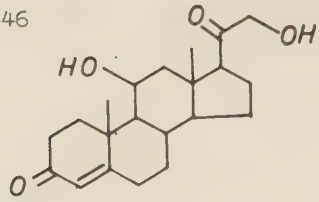
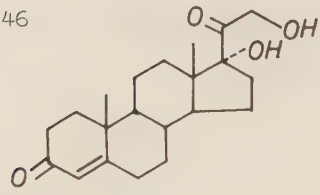
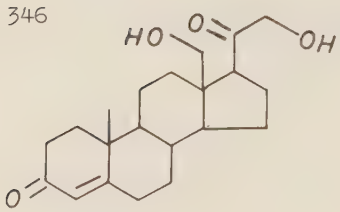
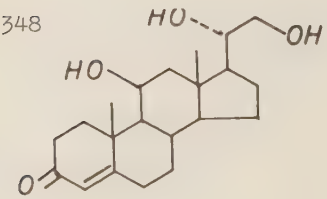
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
318 	3ß-Hydroxy-5α-pregnan-20-on	50
318 	3α-Hydroxy-5ß-pregnan-20-on	81
318 	3ß,20α-Dihydroxy-5-pregnen	50,52,67 70
318 	3ß,20ß-Dihydroxy-5-pregnen	81
320 	3α,20α-Dihydroxy-5α-pregnan	79,81

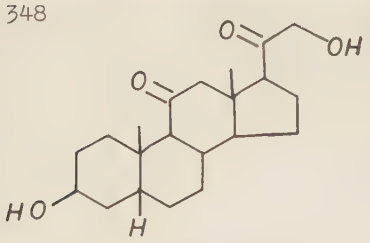
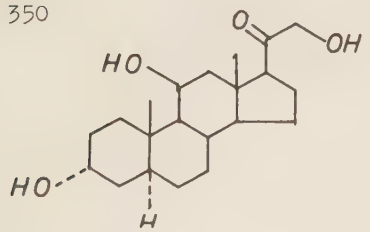
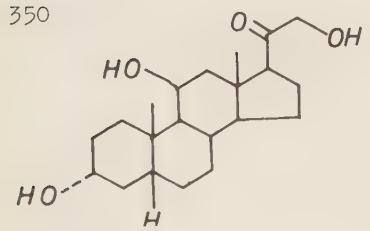
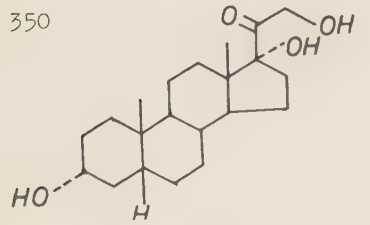
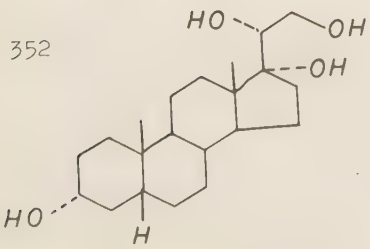
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
320 	3ß,20α-Dihydroxy-5α-pregnan	50,79
320 	3α,20α-Dihydroxy-5ß-pregnan	46,79
328 	4-Pregnen-3,11, 20-trion "11-Ketoprogesteron"	82
330 	17α-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion "17α-Hydroxyprogesteron"	41,72,74, 83
330 	11ß-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion "11-Hydroxyprogesteron"	82

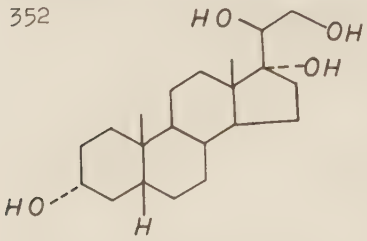
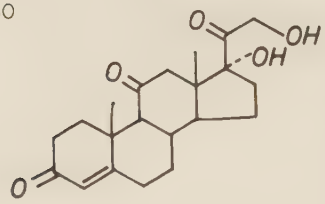
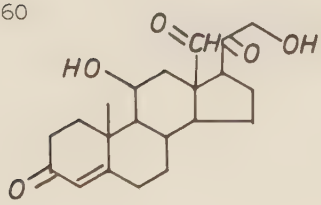
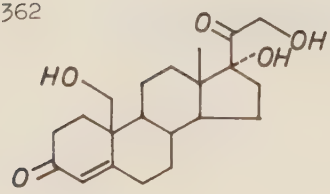
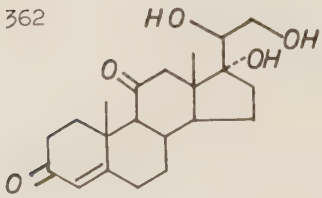
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
330 	16α-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion "16α-Hydroxyprogesteron"	74,83
330 	21-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion "Desoxycorticosteron"	84
332 	17α,20α-Dihydroxy-4-pregnen-3-on	74,83
332 	17α,20ß-Dihydroxy-4-pregnen-3-on	72
332 	3ß,16α-Dihydroxy-5-pregnen-20-on	33

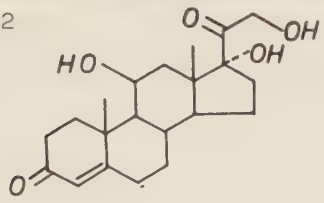
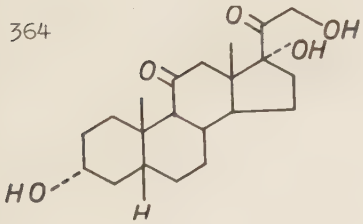
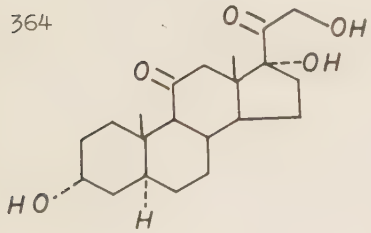
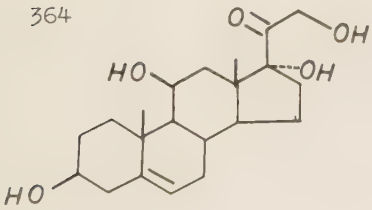
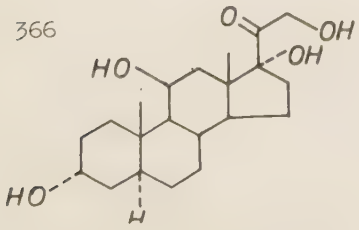
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
332 	3ß,17α-Dihydroxy-5-pregnen-20-on "17α-Hydroxypregnenolon"	29
332 	3ß,21-Dihydroxy-5-pregnen-20-on	33
334 	3α,17α-Dihydroxy-5α-pregnan-20-on	22
334 	3α,17α-Dihydroxy-5ß-pregnan-20-on	22
334 	3ß,17α,20α-Trihydroxy-5-pregnen	33,70

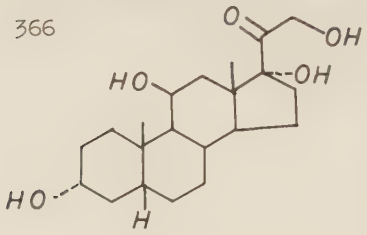
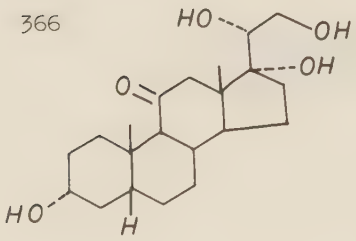
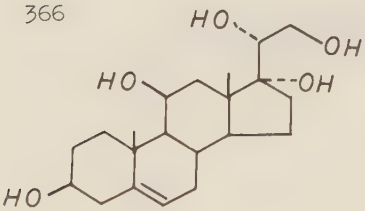
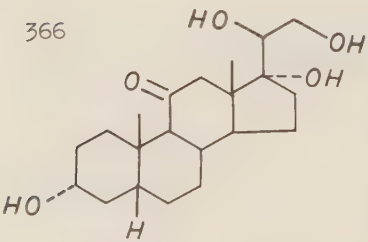
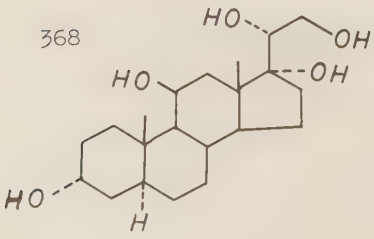
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
334 	3ß,20α,21-Trihydroxy-5-pregnen	47
336 	3α,20α,21-Trihydroxy-5α-pregnan	33,85
336 	3ß,17α,20α-Trihydroxy-5ß-pregnan	46
336 	3α,17α,20α-Trihydroxy-5ß-pregnan	86
336 	3α,16α,20α-Trihydroxy-5α-pregnan	22

Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
344 	21-Hydroxy-4-pregnen-3,11,20-trion "11-Dehydrocorticosteron"	87
346 	11ß,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion "Corticosteron"	29,43,72, 87
346 	17α,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion "11-Desoxycortisol"	72,88
346 	18,21-Dihydroxy-4 pregnen-3,20-dion	89
348 	11ß,20α,21-Trihydroxy-4-pregnen-3-on	90

Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
348 	3ß,21-Dihydroxy-5ß-pregnan-11,20-dion	91
350 	3α,11ß,21-Trihydroxy-5α-pregnan-20-on	90
350 	3α,11ß,21-Trihydroxy-5ß-pregnan-20-on	92
350 	3α,17α,21-Trihydroxy-5ß-pregnan-20-on	92
352 	3α,17α,20α,21-Tetrahxdroxy-5ß-pregnan	91

Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
352 	3α,17α,20ß,21-Tetrahydroxy-5ß-pregnan	91
360 	17α,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,11,20-trion "Cortison"	72,80,87, 92
360 	11ß,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion-18-al "Aldosteron"	40,72,84
362 	17α,19,21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion	40
362 	17α,20ß,21-Trihydroxy-4-pregnen-3,11-dion	93

Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
362 	11ß,17α,21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion "Cortisol"	29,40,42 43,87,88
364 	3α,17α,21-Trihydroxy-5ß-pregnan-11,20-dion "Urocortison"	80,91,92
364 	3α,17α,21-Trihydroxy-5α-pregnan-11,20-dion	91
364 	3ß,11ß,17α,21-Tetrahydroxy-5-pregnen-20-on	94
366 	3α,11ß,17α,21-Tetrahydroxy-5α-pregnan-20-on	91

Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
366 	3α,11ß,17α,21-Tetrahydroxy-5ß-pregnan-20-on "Urocortisol"	29,80,91, 92
366 	3α,17α,20α,21-Tetrahydroxy-5ß pregnan-11-on	86,92
366 	3ß,11ß,17α,20α,21 Pentahydroxy-5-pregnen	81
366 	3α,17α,20ß,21-Tetrahydroxy-5ß-pregnan-11-on	91
368 	3α,11ß,17α,20α,21-Pentahydroxy-5α-pregnan	91

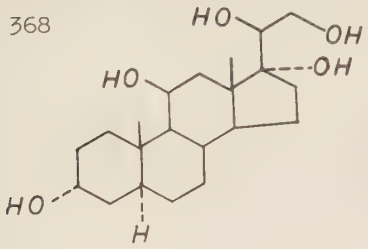
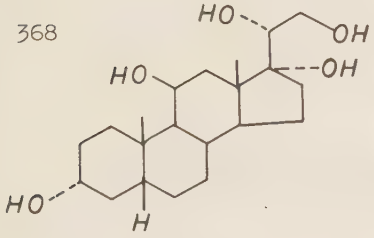
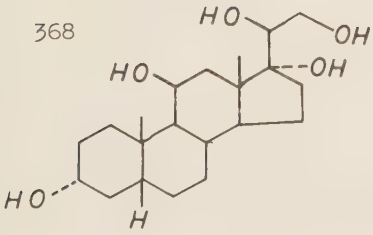
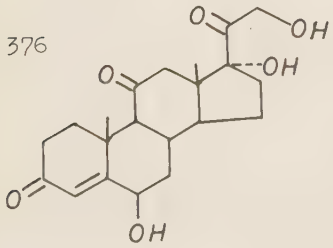
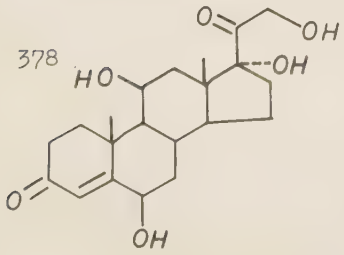
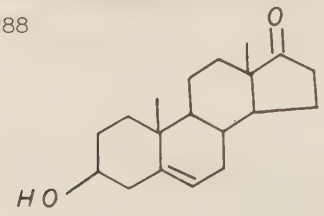
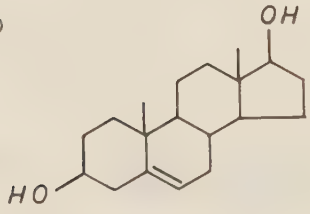
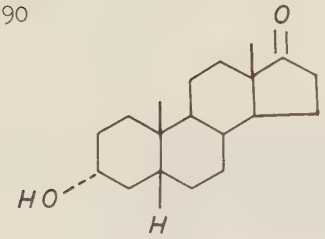
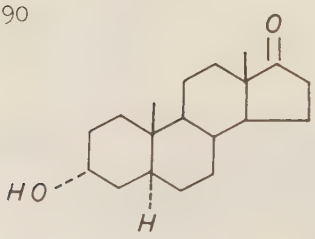
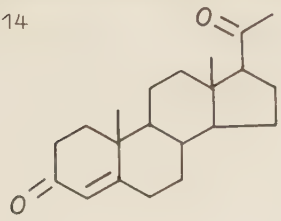
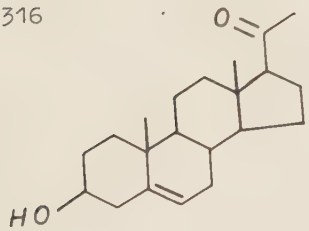
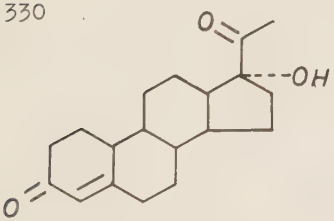
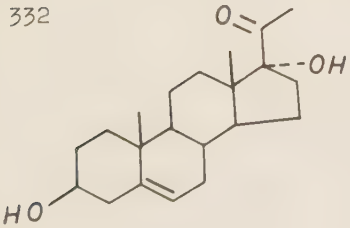
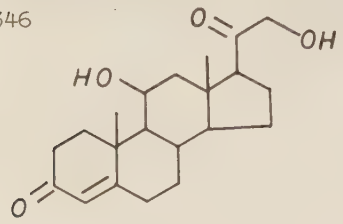
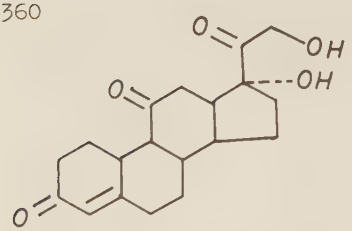
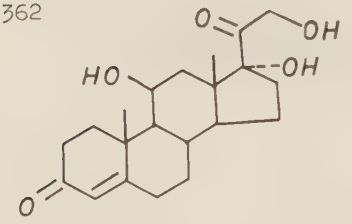
Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
368 	3α,11ß,17α,20ß,21-Pentahydroxy-5α-pregnan	91
368 	3α,11ß,17α,20α,21-Pemtahydroxy-5ß-pregnan	91
368 	3α,11ß,17α,20ß,21-Pentahydroxy-5ß-pregnan	91
376 	6ß,17α,21-Trihydroxy-4-pregnen-3,11,20-trion "6ß-Hydroxycortison"	95,96
378 	6ß,11ß,17α,21-Tetrahydroxy-4-pregnen-3,20-dion "6ß-Hydroxycortisol"	95-97

Tabelle 2

Im Liquor identifizierte Androstane und Pregnane:

Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
288 	3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on "Dehydroepiandrosteron"	56
290 	3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten	56
290 	3∝-Hydroxy-5ß-androstan-17-on "Etiocholanolon"	56
290 	3∝-Hydroxy-5∝-androstan-17-on "Androsteron"	56

Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
314 	4-Pregnen-3,20-dion "Progesteron"	56,57
316 	3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-on "Pregnenolon"	56
330 	17α-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion "17α-Hydroxyprogesteron"	56
332 	3ß,17α-Dihydroxy-5-pregnen-20-on "17α-Hydroxypregnenolon"	56

Molekulargewicht, Formel	Name	Lit.
346 	11ß,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion "Corticosteron"	56
360 	17∝,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,11,20-trion "Cortison"	58
362 	11ß,17∝,21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion "Cortisol"	56, 58-61

IV. Beschreibung des Aufarbeitungsverfahrens

In unserer Arbeitsgruppe wurde schon häufiger der Versuch unternommen, aus Körperflüssigkeiten wie z.B. Blut und Liquor cerebrospinalis, die nur in Spurenmengen vorhandenen Steroide zu isolieren[63,98]. Die bisherigen Versuche sind einerseits an der Schwierigkeit gescheitert, ein Verfahren zu finden, das eine möglichst verlustlose Abtrennung der Steroide von den großen Mengen an Begleitstoffen erlaubte: Die Steroide gingen bei den notwendigen Trennschritten verloren. Andererseits war es auch nicht möglich, die Steroidgemische an gaschromatographischen Säulen einwandfrei zu trennen. Die Verwendung von Glaskapillarsäulen gestattet nun eine entsprechende Steigerung der Empfindlichkeit und Trennschärfe. Hauptsächlich wurde versucht, die Steroidfraktionen durch Extraktionsverfahren und Ausfällen der Begleitstoffe anzureichern.

Das wesentliche Problem lag darin, daß bei der großen Zahl der notwendigen Trennschritte hohe Verluste auftraten und die Gesamtausbeute der zu isolierenden Komponenten sehr gering wurde. Abgesehen davon wurden zu den nicht abgetrennten Begleitstoffen zusätzlich Verschmutzungen aus Filterpapier und Lösungsmitteln eingeschleppt.

Es mußte daher ein Verfahren gesucht werden, das eine fast quantitative Abtrennung der Steroide von Begleitsubstanzen bei geringstem Verlust der Steroide im Trennungsgang zuließ, um gegebenenfalls auch kleine Blutmengen auf Steroide mit einer Gaschromatograph-Massenspektrometerkopplung analysieren zu können.

Neuerdings werden verschiedene chromatographische Methoden Extraktionsverfahren vorgezogen[50-55], weil so eine bessere Anreicherung der Steroide gelingt und Begleitstoffe leichter abgetrennt werden können.

Besonders vorteilhaft ist ein von der Arbeitsgruppe Sjövall[19,50] ausgearbeitetes Trennverfahren, in dem schon im zweiten Trennschritt die Steroidkonjugate in Glucuronide und Sulfate vorgetrennt und angereichert werden. Der Trennungsgang von Sjövall wurde nach eigenen Erfahrungen und Bedürfnissen modifiziert und ergänzt.

Bei dem Versuch, das Sjövall'sche Trennverfahren[50] nachzuarbeiten, mußte festgestellt werden, daß viele Erfahrungen und kleine Kunstgriffe erst selbst erarbeitet und erlernt werden müssen, ehe es möglich wird, einen Trennungsgang ohne Komplikationen zum erfolgreichen Abschluß zu bringen. Wieviel "Laborschmutz" beispielsweise allein durch Filterpapier, Lösungsmittel, unsaubere Glasgeräte und Ähnliches

bei einer Substanzmenge von etwa 500 /ug eingeschleppt werden darf, läßt sich nach Durchsicht von Publikationen unserer Arbeitsgruppe[99,100] und später durch die Erfahrung recht gut abschätzen.

Die ersten Versuche zur Isolierung der Blutsteroide waren daher zwangsläufig nur eine Möglichkeit, um die notwendigen Erfahrungen zu sammeln.

1. Kontrolle des Aufarbeitungsverfahrens

Nach den ersten Trennversuchen konnte eine Fraktion von angereicherten Steroiden, meist Pregnanen, erhalten werden. Diese Probe, die aber noch sehr viele nicht abgetrennte Begleitstoffe und zusätzlich eingeschleppte Verbindungen enthielt, gab den Anstoß, jene Trennschritte systematisch zu suchen, bei denen die größten Verluste auftraten. Das Säulenmaterial jeder Trennsäule sollte mit radioaktivem Material und mit Testgemischen auf seine Wiederfindungsrate und Trennfähigkeit überprüft werden.

Dem Blutplasma wurde also ein radioaktives Steroid zugesetzt, um mit dieser Tracer-Methode jeden Trennschritt auf seine Effektivität hin zu kontrollieren. Die Wahl der markierten Verbindungen fiel auf [7-^{3}H] 3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on-ammonium-sulfat (Dehydroepiandrosteron), weil Dehydroepiandrosteron-sulfat mit 150 /ug/100 ml Plasma das

Steroidsulfat mit der größten Konzentration im Blut darstellt[17-19]. Begleitstoffe stören die radioaktiven Meßmethoden nicht. Man kann die Radioaktivität im Gemisch mit der Szintillationsspektrometrie messen und der Gang der Aufarbeitung läßt sich quantitativ und qualitativ auswerten.

Die Wiederfindungsrate in Prozenten ausgedrückt, gilt exakt nur für das eingesetzte radioaktive Steroid. Man kann aber annehmen, daß die meisten neutralen hydroxylierten Steroide im Blut vergleichbare chemische und physikalische Eigenschaften haben, ähnliche Wiederfindungsraten zeigen und am Ende des Trennungsganges mit dem Dehydroepiandrosteron zusammen als Steroidgemisch analysiert werden können. Dieser Trennungsgang wurde nur für die neutralen hydroxylierten Steroide ausgearbeitet. Östrogene lassen sich nicht erfassen, Ketosteroide können mit dem hier angegebenen Verfahren nicht derivatisiert werden und leider werden die Corticosteroide im ersten Trennschritt wahrscheinlich von der Säule gewaschen[101].

Um den Verlust der radioaktiven Verbindung gering zu halten, wird dem Trennungsgang ein sogenanntes "kaltes" Steroid - die entsprechende unmarkierte Verbindung - zugesetzt. Bei den meisten Aufarbeitungen wurde darauf verzichtet, weil im Blut genügend natürliches Dehydroepiandrosteronsulfat vorhanden ist.

Wichtig war, nach mehreren Aufarbeitungen mit dieser Methode ein reproduzierbares Ergebnis zu erzielen, in dem jeder Trennschritt mit einer konstanten Wiederfindungsrate belegt werden konnte. Zum anderen sollte die Steroidfraktion scharf bestimmt werden und somit leichter von Begleitstoffen, (Fetten, Fettsäuren, Cholesterin) abgetrennt werden können.

2. Trennungsgang der Steroidsulfate

Da sich die Steroidsulfate am leichtesten isolieren lassen und im Blut im Vergleich zu den freien Steroiden und Glucuroniden in größeren Mengen vorliegen, wurden in dieser Arbeit hauptsächlich Steroidsulfate untersucht.

Das Schema des Trennungsganges der Steroidsulfate soll einen Überblick über alle notwendigen Trennschritte, die im folgenden diskutiert werden, vermitteln:

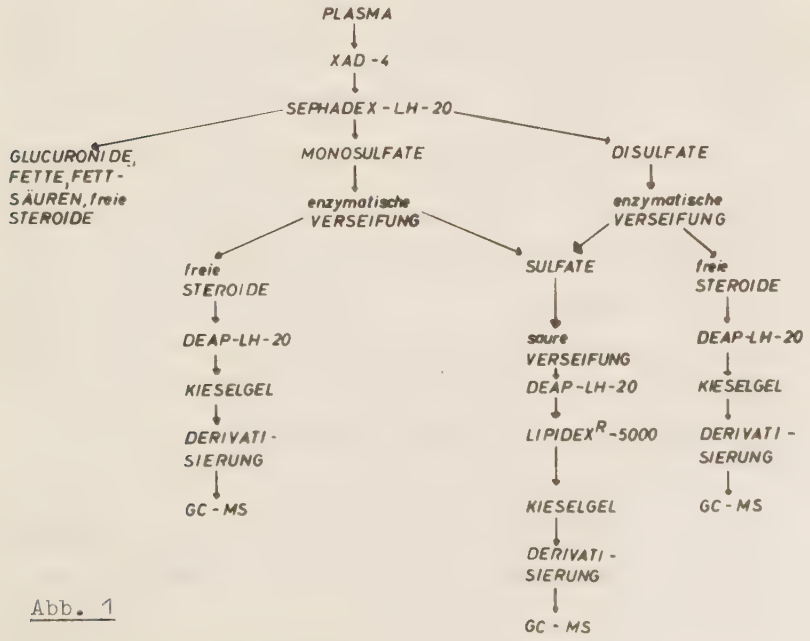


Abb. 1

2.1 Abtrennung des Eiweißes an XAD

Von Sjövall wurde vorgeschlagen[50], im ersten Trennschritt das Eiweiß durch Ausfällen mit einem 10fachen Volumen an Ethanol-Chloroform 1:1 abzutrennen. Eine Wiederfindungsrate des markierten Steroids von nur 40 % konnte ermittelt werden. Als Hauptgrund für eine so niedrige Wiederfindungsrate mußte angenommen werden, daß das ausfallende Eiweiß die Steroidsulfate mitreißt, eine verständliche Tatsache, wenn man bedenkt, daß die Konzentration des Eiweißes im Plasma um einen Faktor 10^5 größer ist.

Da für eine erträgliche Gesamtwiederfindungsrate nicht schon im ersten Trennschritt auf 60 % der Steroide verzichtet werden konnte, mußte daß Eiweiß auf anderem Wege abgetrennt werden.

In unserer Arbeitsgruppe ist es üblich, bei Urinaufarbeitungen die freien Steroide und Steroidkonjugate an Amberlite XAD-2 und XAD-4 - einem Adsorberharz auf Polystyrolbasis - zu adsorbieren und von Glucose, anorganischen Salzen, kleinen organischen Molekülen und von Proteinen zu befreien. Bradlow[102] konnte zeigen, daß mit dieser Methode mehr als 90 % der Urinsteroide gewonnen werden können.

Dieses Verfahren wurde auch bei der Isolierung der Blutsteroide angewendet. Anfangs fiel bei den Säulentrennungen

Eiweiß durch Alterung aus, verstopfte die Säule und verhinderte seine Abtrennung. Nach Sjövall[55] sollte eine Verdünnung des Plasmas auf das Doppelte das Ausfallen von Eiweiß verhindern, aber leider genügte diese Verdünnung noch nicht. Auf einen Hinweis von Prof. Dengler wurde das Blutplasma auf das 10fache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und jetzt gelang eine einwandfreie Trennung.

Proteine, Salze, Glucose und restliche Bilirubinfarbstoffe passierten die Säule und die angereicherte Steroidfraktion konnte mit Methanol eluiert werden. Bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 10 ml/min wurde die Plasmalösung nacheinander 5 mal an der XAD-4-Säule extrahiert. Da beim einmaligen Durchlauf nur ein Anteil von 70 % erhalten werden konnte, wurde der Prozeß mehrere Male wiederholt. Nach jeder Extraktion an XAD-4 wurden die organischen Bestandteile eluiert.

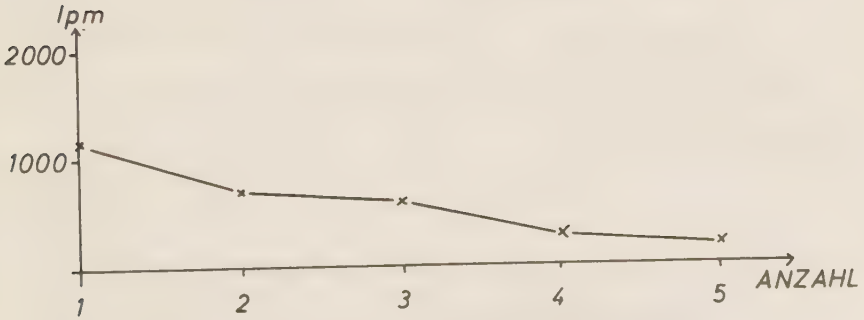


Abb.: 2

Die Kurve gibt die Adsorption des radioaktiven Steroides an XAD-4 an. Auf der Abszisse ist die Anzahl der Durchläufe aufgetragen, auf der Ordinate die Radioaktivität der Proben in "Impulsen pro Minute" (Ipm). (Eine Radioaktivität von 1 /uC bei tritiummarkierten Verbindungen entspricht 222800 Ipm).

Die Gesamtwiederfindungsrate wurde nach 5 Durchläufen mit 95 % ermittelt. Die Abtrennung des Eiweißes an XAD-4 verlief also mit wesentlich besserem Ergebnis als die Ausfällung.

Senkt man die Durchflußrate auf 100 ml/h, so kann man bereits mit einem Adsorptionsschritt circa 90 % der Steroide anreichern. Eine Wiederfindungsrate von 91 % wurde mit der Szintillationsmessung ermittelt. Da der Zeitaufwand für beide Varianten in etwa der gleiche, der Arbeitsaufwand für die letzte Variante kleiner ist, wurde das zuletzt beschriebene Verfahren beibehalten. Da für beide Aufarbeitungen ähnliche Wiederfindungsraten (1. 91 %, 2. 95 %) gefunden wurden, kann dieser Trennschritt als reproduzierbar angesehen werden.

2.2 Trennung an Sephadex-LH-20

Die Steroidkonjugate wurden im folgenden Trennschritt an Sephadex-LH-20 in Glucuronide, Mono- und Disulfate fraktioniert.

Mit einem Gemisch aus Dehydroepiandrosteron und Cholesterin wurde die Trennleistung der Sephadex-LH-20-Säule für diese Steroide getestet. Das unten abgebildete Elutionsdiagramm gibt die Verteilung der beiden Steroide an. Die Verteilung der Steroide wurde gaschromatographisch und gravimetrisch bestimmt. Die Wiederfindungsrate betrug 95 %.

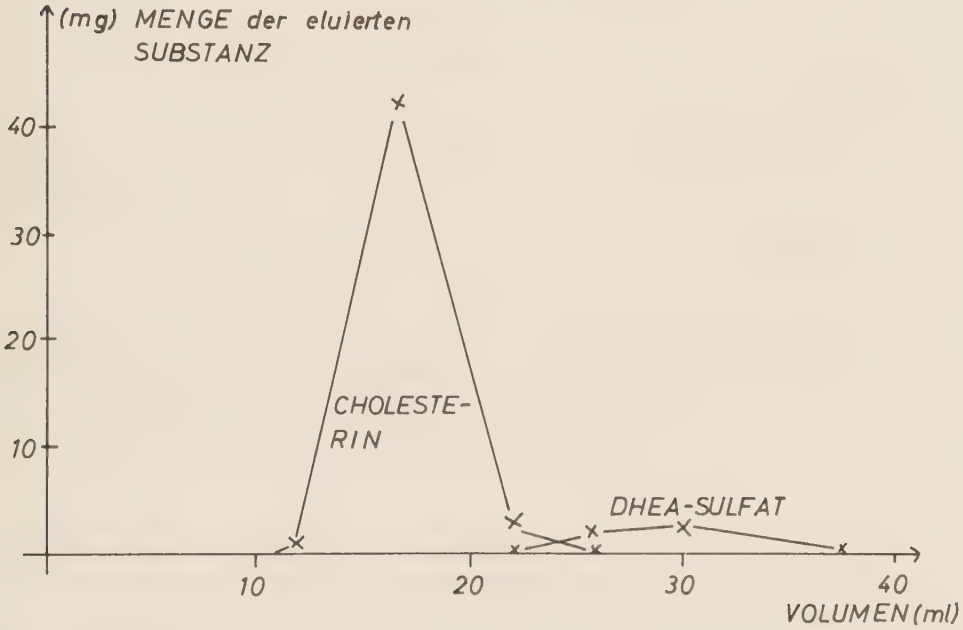


Abb.: 3

Dann wurde die Säule mit Dehydroepiandrosteronsulfat und "kaltem" Steroid ohne Zusatz von Blutplasma getestet. Szintillationsmessungen ergaben eine Wiederfindungsrate von 95 %.

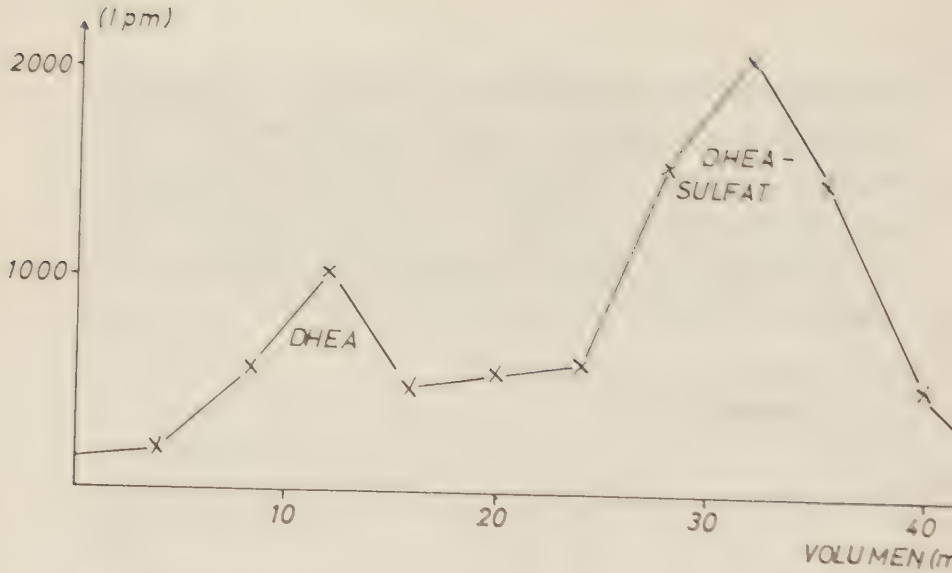


Abb.: 4

Das Diagramm gibt die Elutionskurve des radioaktiven Steroids an. Die Wiederfindungsrate dieses Trennschrittes wurde bei drei Aufarbeitungen gemessen und wies durchschnittlich 85 % auf (1. 88 %, 2. 80 %, 3. 88 %).

Die Verschiebung der Wiederfindungsrate im Vergleich zu den Tests mit reinen Verbindungen wird offenbar durch die vielen Begleitstoffe der Steroide in biologischem Material verursacht. Andererseits treten beim notwendigen Umfüllen, Eindampfen und Filtrieren der Proben Verluste zwischen den Trennschritten auf.

Löst man vor der Säulentrennung die Proben in mehr als 1 ml Volumen auf oder verwendet zum Lösen nicht das später verwendete Laufmittel, so treten Trennfehler auf, die nur unter Substanzverlust korrigiert werden können. Auch die Abtrennung von Cholesterin, Fetten, Fettsäuren und anderen Lipiden gelingt nicht mehr einwandfrei.

2.3 Verseifung und Extraktion

Die Mono- und Disulfate werden nach Verdampfen des Lösungsmittels getrennt verseift. Sjövall[50] schlägt hier eine saure Verseifung nach Burstein und Lieberman[103] vor. In dieser Arbeit wurde zunächst eine enzymatische Verseifung mit ß-Glucuronidase/Arylsulfatase aus Helix pomatia durchgeführt[104], weil sie schonender verläuft als eine saure. Anschließend wurden die unverseiften Konjugate aus beiden Fraktionen zusammengefügt und nach Burstein und Lieberman sauer nachverseift.

Bei der enzymatischen Verseifung wurde in drei Aufarbeitungen eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 75 % gefunden (1.65 %, 2.74 %, 3.80 %). Die freigesetzten Steroide wurden mit Essigester aus der wäßrigen Lösung extrahiert. Das Diagramm zeigt die Extraktionskurve an. Jeder Meßpunkt entspricht einer Extraktion mit frischem Essigester.

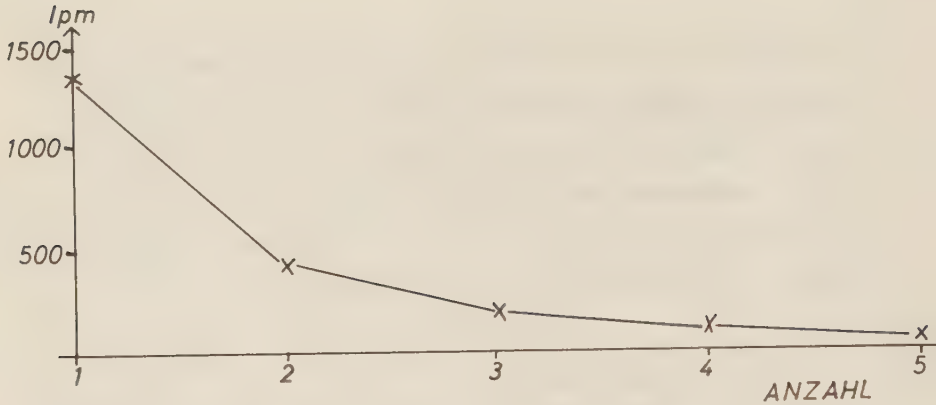


Abb.: 5

An dieser Kurve läßt sich ablesen, daß drei Extraktionen notwendig sind, aber alle weiteren das Ergebnis nicht mehr verbessern. Nur noch Verunreinigungen aus dem Lösungsmittel können in die Probe eingeschleppt werden. Bei späteren Trennungen wurde daher nur dreimal extrahiert.

Da die enzymatische Verseifung nicht quantitativ verlaufen war, wurden von beiden Fraktionen die wäßrigen Phasen der Essigesterextraktionen zusammengefügt und die verbliebenen Sulfate an XAD-4 adsorbiert, um sie so von restlicher Helicase und Natriumacetat zu befreien. Die Sulfate wurden daraufhin mit Methanol eluiert und nach Burstein und Lieberman mit durch Schwefelsäure acidifiziertem Essigester verseift[103].

2.4 Trennung an DEAP-LH-20

Die verseiften Fraktionen wurden einzeln an DEAP-LH-20, einem schwach basischen Ionenaustauscher auf Sephadex-Basis, von Fettsäuren befreit.

Bevor die DEAP-LH-20-Säule zur Entfernung von Fettsäuren im Trennungsgang verwendet werden konnte, wurde sie mit einem Testgemisch und dann mit radioaktivem Dehydroepiandrosteron auf ihre Trennleistung untersucht:

Eine Mischung aus Palmitinsäure, Cholesterin und Dehydroepiandrosteron wurde an einer DEAP-LH-20-Säule getrennt. Im Eluat konnte Palmitinsäure weder dünnschicht- noch gaschromatographisch nachgewiesen werden. Das Elutionsdiagramm zeigt die Verteilung der beiden Steroide, die im Überschneidungsgebiet gaschromatographisch bestimmt werden konnte. Die Meßwerte wurden gravimetrisch ermittelt. Die Wiederfindungsrate betrug 85 %.

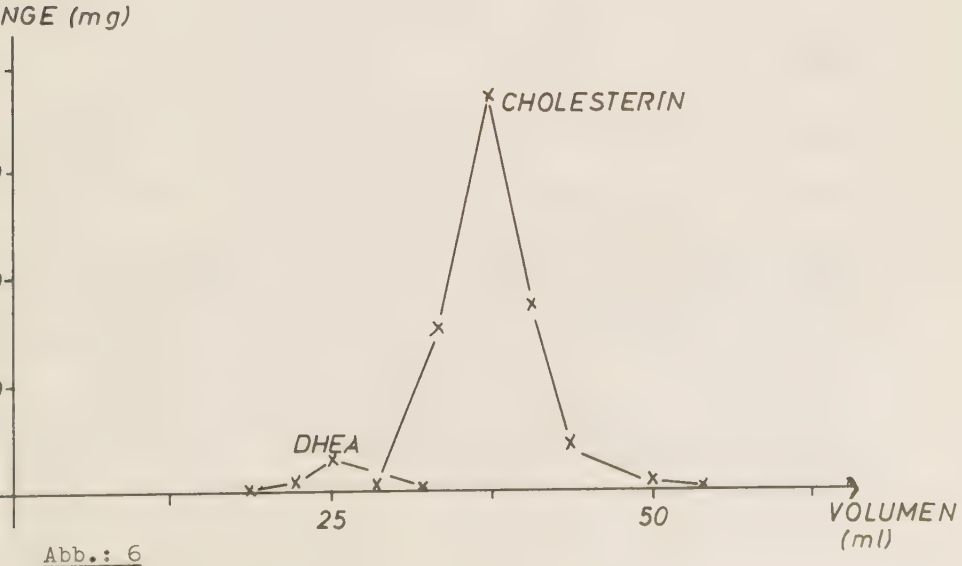


Abb.: 6

Zusätzlich wurde die Wiederfindungsrate des radioaktiven Dehydroepiandrosterons im Trennungsgang der Blutsteroide mit einem Szintillationszähler bestimmt. Es wurden wieder drei Aufarbeitungen ausgewertet. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug 85 % (1. 70 %, 2. 95 %, 3. 80 %).

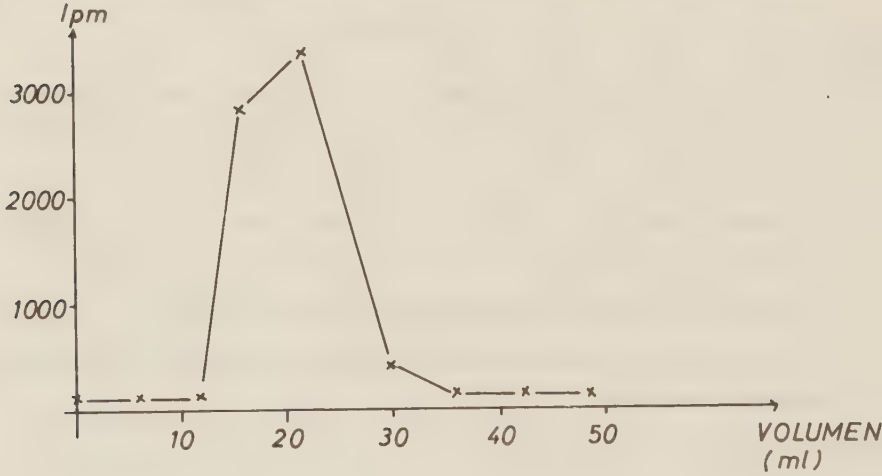


Abb.: 7

Fettsäuren und Glyceride können nämlich bis in die Sulfatfraktionen mitgeschleppt werden: Die Glyceride werden dann zum Teil von geringen Mengen an Esterase, die die Helicase enthält, gespalten. Die sauer verseiften Fraktionen enthalten wesentlich mehr freie Fettsäuren als die enzymatisch verseiften Fraktionen. Wahrscheinlich reicht die geringe Menge an Esterase zu einer vollständigen Spaltung der Fette nicht aus.

Bei den sauer verseiften Proben ist eine Abtrennung der Fettsäuren notwendig, da in diesen Fraktionen die Konzentration an Fettsäuren erheblich höher ist als die der Steroide und so die spätere Trennung an Glaskapillarsäulen wesentlich gestört wird.

Die enzymatisch verseiften Steroidproben enthalten in den meisten Fällen nur sehr geringe Mengen an Fettsäuren, sofern der Trennungsgang bisher ohne Fehler durchgeführt wurde. Trennt man von den enzymatisch verseiften Steroidgemischen die Fettsäuren ab, so lassen sich am Ende des Trennungsganges Steroidgemische analysieren, die nahezu frei von Beimengungen sind.

2.5 Trennung am Lipidex^{R}-5000

Das sauer verseifte Steroidgemisch enthielt sehr viel Cholesterin. Cholesterin kann an einer Lipidex^{R}-5000-Säule mit einem von Sjövall[55)] angegebenen Laufmittel abgetrennt werden.

Es wurden wieder Versuche mit Testgemischen und einem radioaktiven Steroid durchgeführt, um die Säule mit dem angegebenen Laufmittelsystem zu testen:

Ein Gemisch von Dehydroepiandrosteron und Cholesterin wurde an Lipidex getrennt. Die Wiederfindungsrate für beide

Steroide betrug jeweils 95 %. Das Elutionsdiagramm zeigt, daß die Trennung von Cholesterin und Dehydroepiandrosteron im Idealfall quantitativ verläuft:

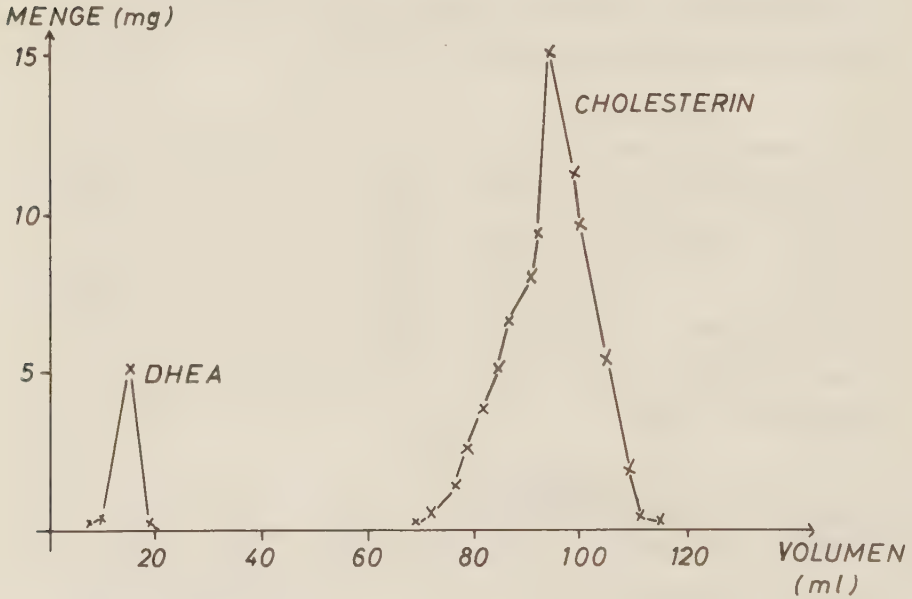


Abb.: 8

Die Wiederfindungsrate des radioaktiven Steroids wurde, wie bisher in allen Trennungsgängen, dreimal bestimmt und betrug circa 85 % (1. 82 %, 2. 85 %, 3. 90 %).

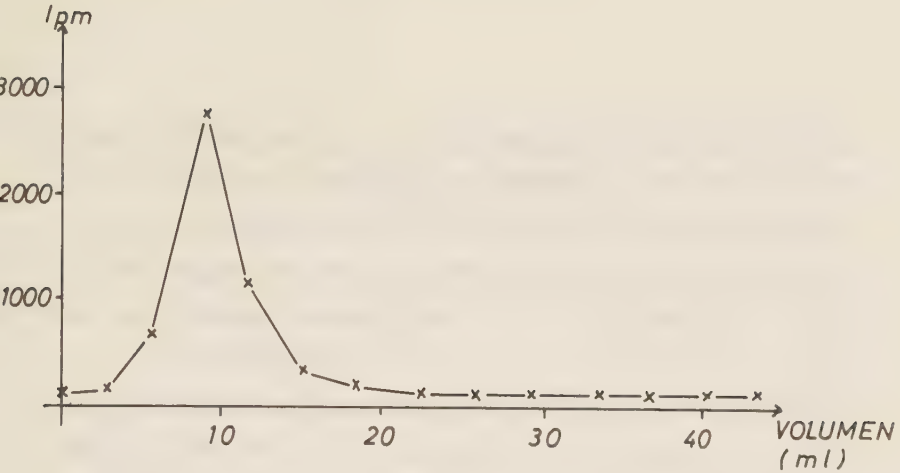


Abb.: 9

Auch hier konnte wieder der Effekt beobachte werden, daß im Trennungsgang der Blutsteroide, bedingt durch die übrigen Komponenten, die das Steroidgemisch auch jetzt noch enthält, die Wiederfindungsrate kleiner ausfällt.

2.6 Reinigung an Kieselgel

In der letzten Trennstufe wurden alle drei Fraktionen von Begleitstoffen an einer Kieselgelsäule befreit[54]: Die Mischung der Steroide wurde in einem nur wenig polaren Laufmittelsystem (Benzol/Essigester, 95:5) auf die Säule gebracht. In diesem Laufmittelsystem wurden alle unpolaren Verbindungen - wie beispielsweise eingeschleppte Phthalester - eluiert. Die polaren Hydroxysteroide besitzen in diesem Laufmittel einen geringen R_f-Wert und können anschließend mit einem polaren Laufmittel (Essigester) eluiert werden. Auf diese Weise können nahezu reine Steroidgemische aus Blut isoliert werden.

Auch die Kieselgelsäule wurde auf ihre Trennfähigkeit geprüft: Ein Testgemisch aus Phthalsäurebis-(-2-ethylhexylester), Cholesterin, Glycerintripalmitat, Dehydroepiandrosteron und 11ß-Hydroxyprogesteron wurde an einer Kieselgelsäule getrennt. Glycerintripalmitat und Phthalester wurden mit dem wenig polaren Laufmittel eluiert, die Steroide anschließend mit dem polaren. Ein zweiter Trennversuch wurde mit radioaktivem Dehydroepiandrosteron und "kaltem" Steroid durchgeführt. In der unpolaren Phase wurde keine nennenswerte Radioaktivität gemessen, dagegen in der polaren Phase 95 % der eingesetzten Radioaktivität.

Im Trennungsgang wurde dann durchschnittlich eine Wiederfindungsrate von 70 % erhalten (1. 68 %, 2. 75 %, 3. 74 %). Die Abweichung läßt sich auch hier damit erklären, daß gerade in der letzten Aufarbeitungsstufe sehr viele Begleitstoffe - so auch restliche Bilirubinfarbstoffe, die auf dem Kieselgel verbleiben - abgetrennt wurden. Diese Stoffe übertreffen mengenmäßig bei weitem die Steroide.

2.7 Derivatisierung

Die an Kieselgel gereinigten Steroidgemische wurden mit MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluor-acetamid) in die Trimethylsilylether überführt. Die Reaktionslösung wurde ohne weitere Aufarbeitung einer Analyse mit einer Glaskapillargaschromatograph-Massenspektrometer-Kopplung unterworfen.

2.8 Übersicht und Resultat der Aufarbeitungskontrolle für den Trennungsgang der Steroidsulfate

Jede der Trennoperationen - fünf für die enzymatisch verseiften Sulfate und sieben für die anschließend sauer verseiften - wurde überprüft.

Die Säulenmaterialien Sephadex-LH-20 und Lipidex^{R}-5000 wurden jeweils zwei verschiedenen Testverfahren unterworfen: Zuerst wurden Modellgemische an diesen Säulen getrennt und anschließend die Trennsäulen mit radioaktivem Dehydroepiandrosteronsulfat beziehungsweise Dehydroepiandrosteron auf ihre Wiederfindungsrate geprüft. Die Ergebnisse beider Testverfahren stimmten für die jeweiligen Säulenmaterialien in ihrer Wiederfindungsrate und Elutionsvolumen gut überein.

Der erste Aufarbeitungsschritt nach Sjövall[50] - das Ausfällen des Eiweißes mit organischen Lösungsmitteln - konnte durch eine Säulentrennung an XAD ersetzt werden, da dieser Trennschritt sehr verlustreich verlief. Weiterhin bewährte sich, die saure Verseifung im Sjövall'schen Trennungsgang gegen eine enzymatische auszutauschen, da eine enzymatische Verseifung schonender verläuft, und eine zusätzliche Abtrennung der Fettsäuren einzuführen.

Die Gesamtwiederfindungsrate des vollständigen Trennungsganges der Monosulfate beträgt annähernd 30 %. Diese Menge

reicht auch noch aus, um aus 10 ml Plasmaproben die isolierten Steroidgemische (schätzungsweise verbleiben 10 /ug Steroide) in einer Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kopplung untersuchen zu können und "Profile" an Glaskapillarsäulen aufzunehmen.

In den nachfolgenden Blutaufarbeitungen zeigte sich, daß die Monosulfatfraktionen problemlos zu isolieren und nahezu rein dargestellt werden konnten.

Die Disulfate waren schwieriger zu isolieren, da sie wahrscheinlich zu Anfang des Trennungsganges zum Teil von der XAD-Säule gewaschen wurden[101]. Diese Fraktionen unterschieden sich in ihrer Menge und Zusammensetzung teilweise erheblich voneinander.

In den Fraktionen der sauer verseiften Steroidsulfate wurden zu Anfang der Aufarbeitungen Steroide identifiziert. Später konnten die Aufarbeitungen routinierter durchgeführt werden, und nahezu alle Steroide wurden bereits enzymatisch verseift: In den sauer nachverseiften Fraktionen wurden keine Steroide mehr gefunden.

3. Trennungsgang der Glucuronide

Die Glucuronide können auf zwei verschiedenen Wegen isoliert werden: Die Steroidkonjugate wurden nach dem Sulfattrennungsgang angereichert und an Sephadex aufgetrennt. Die Fraktion,

die Glucuronide, Fette, Fettsäuren, freie Steroide und sonstige Lipide enthielt, wurde nach dem Eindampfen des Lösungsmittels zwischen Wasser und Ether verteilt. Die wäßrige Phase enthielt die angereicherten Steroidglucuronide.

Die andere Möglichkeit besteht darin, das unverdünnte Plasma mit Ether auszuschütteln und auf diese Weise Fettsäuren, Fette und freie Steroide abzutrennen (aus dieser Fraktion können die freien Steroide isoliert werden). Beliebige Lösungsmittel wie z.B. Chloroform oder Methylenchlorid können nicht zum Ausschütteln verwendet werden, da die Plasmaproteine ausfallen und dann die Extraktion erheblich erschwert wird.

Das Plasma wurde wie im Sulfattrennungsgang weiter aufgearbeitet: Anschließend wurde die Glucuronidfraktion mit ß-Glucuronidase aus E. coli enzymatisch verseift. Die freien Steroide wurden aus der wäßrigen Phase mit Essigester extrahiert, die restlichen Fettsäuren in dieser Fraktion an DEAP-LH-20 und Cholesterin an Lipidex abgetrennt. Dann wurden die Steroide an Kieselgel von unpolaren Begleitstoffen befreit und nach der Derivatisierung mit MSTFA in der GC-MS-Kopplung analysiert.

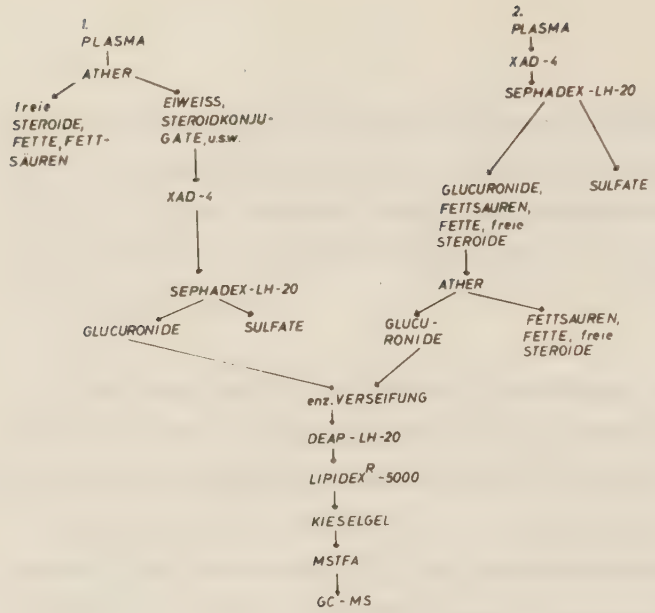


Abb.: 10 Trennungsgang der Glucuronide

4. Trennungsgang der proteingebundenen Steroide

Ein großer Teil der Blutsteroide ist an Proteine gebunden. Die freien Steroide lassen sich massenspektrometrisch der Analyse zugänglich machen, wenn die Steroidproteinbindung gelöst wird. Diese Bindung läßt sich thermisch oder durch Lösungsmittel spalten.

Der Trennungsgang der proteingebundenen und freien Steroide, die miteinander im Gleichgewicht stehen, lehnt sich ebenfalls an ein von Sjövall beschriebenes Verfahren an[55].

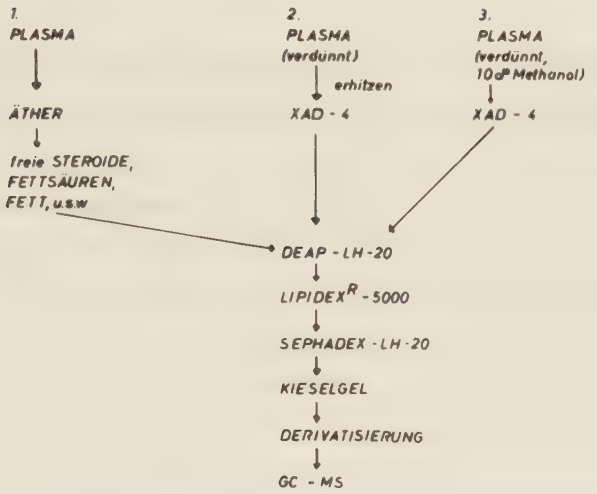


Abb.: 11 Trennungsgang der freien Steroide

Nach Sjövall[55] sollten die Steroide an XAD-2 in einer beheizten Mantelsäule vom Protein befreit und am Säulenmaterial adsorbiert werden. Dieser Trennschritt mußte modifiziert werden, da ausgefallenes Eiweiß die Trennsäule verstopfte. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde Plasma, dem auch hier zur Kontrolle des Aufarbeitungsverfahrens radioaktives Dehydroepiandrosteron zugesetzt worden war, auf das 10fache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, mit XAD-4 versetzt und im Wasserbad im Batch-Verfahren bei erhöhter Temperatur gerührt. Die Wiederfindungsrate des radioaktiven Steroides betrug im Schnitt 80 % (1. 70 %, 2. 85 %, 3. 80 %). Allerdings konnte nur die Adsorption des radioaktiven Dehydroepiandrosterons mit dieser Methode kontrolliert werden, aber nicht die Spaltung der Steroid-Prote-

inbindung, deshalb ist die Wiederfindungsrate dieses Trennschrittes mit einem schwer abschätzbaren Fehler behaftet.

Eine zweite Möglichkeit zur Erfassung des proteingebundenen Steroids ist durch Ausschütteln mit Ether gegeben. Dabei wird die Proteinbindung gespalten, die sich auch lösen läßt, wenn man der physiologischen Kochsalzlösung 10 % Methanol hinzufügt und dann die Steroide bei Raumtemperatur an XAD adsorbiert.

Alle drei Methoden zur Spaltung der Protein-Steroidbindung wurden angewendet. Es läßt sich nicht abschätzen, welche Methode am besten geeignet ist.

Die Fraktion der freien Steroide wurde nach der Spaltung der Protein-Steroidbindung und Entfernung des Eiweißes an DEAP-LH-20 von Fettsäuren befreit, da die Fraktionen der freien Steroide von sehr vielen Fettsäuren begleitet werden. Die Wiederfindungsrate dieses Trennschrittes wurde mit 85 % ermittelt.

An einer Lipidex^{R}-5000-Säule wurde dann Cholesterin abgetrennt (Wiederfindungsrate 85 %).
Bei den ersten Aufarbeitungen wurde nachfolgend das Steroidgemisch an Kieselgel gereinigt. Gaschromatographisch und massenspektrometrisch ließ sich feststellen, daß sehr viele Begleitstoffe an Kieselgel nicht abgetrennt werden können,

deshalb wurden die Steroide vor der Reinigung an Kieselgel noch einmal an Sephadex mit einem unpolaren Laufmittel fraktioniert, wobei die erste Fraktion einen großen Teil der Glyceride enthielt und verworfen wurde[105].

Diese Sephadex-Säule wurde, wie bisher, mit Dehydroepiandrosteron als Testsubstanz und radioaktivem Steroid (hier mit Testosteron, einem Isomeren des Dehydroepiandrosterons, da kein Dehydroepiandrosteron mehr zur Verfügung stand) auf ihre Trennfähigkeit überprüft.

An der Sephadex-Säule wurde die Elutionskurve des Dehydroepiandrosterons als Testsubstanz aufgenommen:

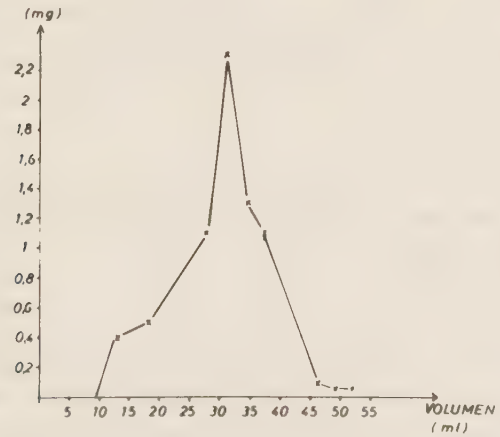


Abb.: 12

Die Wiederfindungsrate wurde mit reinem Dehydroepiandrosteron als Testsubstanz mit 96 % ermittelt. Eine zweite Elutionskurve wurde mit dem radioaktiven Testosteron aufgenommen. Die Wiederfindungsrate betrug 98 %:

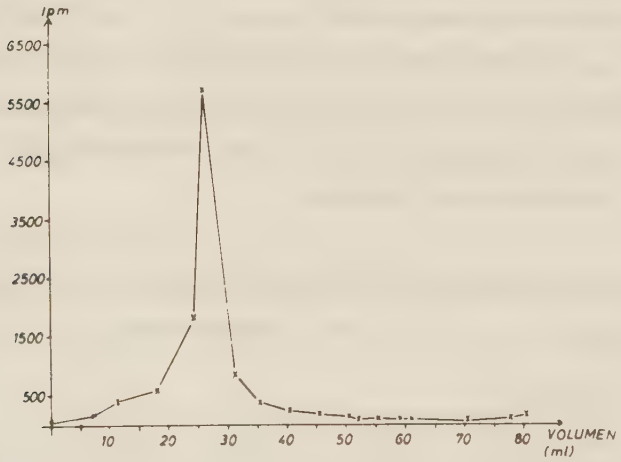


Abb.: 13

Im Trennungsgang konnten durchschnittlich 85 % Wiederfindungsrate ermittelt werden.

Die Steroide wurden dann an Kieselgel von Begleitstoffen befreit (Wiederfindungsrate 75 %) und mit MSTFA zur massenspektrometrischen Analyse in die Trimethylsilylether überführt.

Während der nächsten Aufarbeitungen ergab sich, daß die Begleitstoffe der Steroide bisher nicht quantitativ entfernt werden konnten. Aber das Verfahren konnte soweit ausgearbeitet werden, daß Massenspektren von im Blut unbekannten Steroiden aufgenommen werden konnten.

Es ist nun möglich, die Trennungsgänge unter verschiedenen Aspekten durchzuführen: Einmal kann ein großer Ansatz Plasma (1 l oder mehr)aufgearbeitet werden, um unbekannte Blutsteroide zu isolieren - dabei läßt sich der Trennungsgang nach Bedarf noch weiter modifizieren -, zum anderen können halbquantitative Bestimmungen der Steroide ("Profile") an Glaskapillarsäulen aufgenommen und zur Klärung von Steroidstoffwechselstörungen herangezogen werden.

V. Ergebnisse und Diskussionen

1. Biosynthese der Steroide

Die Blutsteroide entstehen aus Cholesterin, das über das Lanosterin, Squalen, "aktives Isopren" aus "aktivierter Essigsäure" (Acetyl-CoA) aufgebaut wird. Die Biosynthese der Steroide vollzieht sich in den Keimdrüsen und in der Nebennierenrinde (NNR), in der hauptsächlich Corticosteroide und das 3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on (Dehydroepiandrosteron) produziert werden.

In den männlichen Keimdrüsen entsteht Testosteron über das 4-Androsten-3,17-dion aus 17α-Hydroxyprogesteron, die weiblichen Keimdrüsen produzieren aus Testosteron die Östrogene.

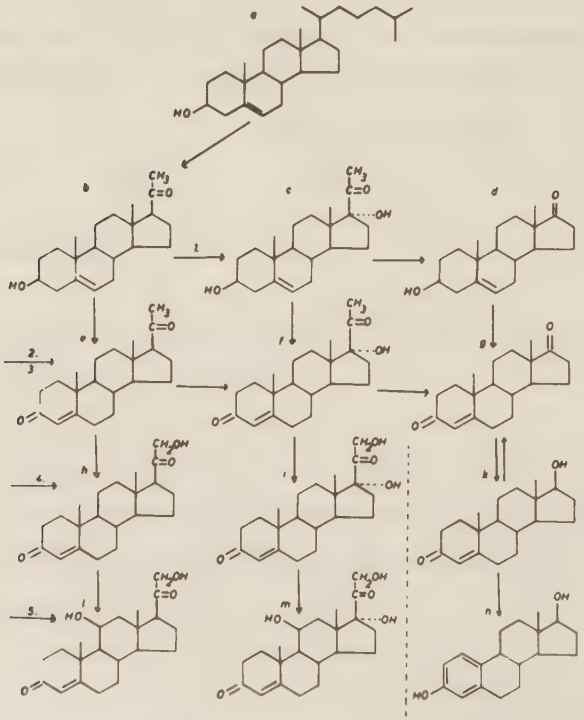


Abb.: 14

Schema der Steroidbiosynthese

Dehydroepiandrosteron wird mit Sulfat konjugiert, während die meisten anderen Steroide unkonjugiert von der NNR in das Blut sezerniert werden. Die unkonjugierten Steroide werden an Proteine gebunden - das Cortisol beispielsweise zum größten Teil an das Protein Transcortin - und stehen mit ihren freien Steroiden im Gleichgewicht.

Erläuterungen zu Abb. 14

a) 3ß-Hydroxy-5-cholesten
"Cholesterin"

b) 3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-on
"Pregnenolon"

c) 3ß,17α-Dihydroxy-5-pregnen-20-on
"17α-Hydroxypregnenolon"

d) 3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on
"Dehydroepiandrosteron"

e) 4-Pregnen-3,20-dion
"Progesteron"

f) 17α-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion
"17α-Hydroxyprogesteron"

g) 4-Androsten-3,17-dion

h) 21-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion

i) 17α,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion
"11-Desoxycortisol"

k) 17ß-Hydroxy-4-androsten-3-on
"Testosteron"

l) 11ß,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion
"Corticosteron"

m) 11ß,17α,21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion
"Cortisol"

n) 3,17ß-Dihydroxy-östran
"Östradiol"

1. 17α-Hydroxylase
2. 3ß-Dehydrogenase
3. Δ^5,Δ^4-Isomerase
4. 21-Hydroxylase
5. 11ß-Hydroxylase

Erstes wichtigstes Umwandlungsprodukt des Cholesterins ist das 3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-on (Pregnolon). Die Seitenkette wird an C-20 und C-22 hydroxyliert und durch eine Abspaltung von Isocapronaldehyd verkürzt. Pregnenolon wird zum 4-Pregnen 3,20-dion (Progesteron) unter Isomerisierung der Doppelbindung (Δ^5,Δ^4-Isomerase) dehydriert. Die Corticosteroide werden durch stellungsspezifische Hydroxylasen aufgebaut: Zuerst wird das C-Atom in Stellung 17α hydroxyliert, dann in Stellun 21 und zuletzt in Stellung 11ß.

Der Gehalt der NNR an Hormonen ist sehr gering, aber die Syntheseleistung ist erheblich: Alle 2-3 Stunden wird die gesamt Hormonmenge des menschlichen Organismus erneuert. Der Hormonproduktion steht ein gleich großer Abbau in der Leber gegenüber: Die Steroide werden metabolisiert und an Glucuronsäure gekuppelt. Die Mehrzahl der Ausscheidungsprodukte sind 3α-Hydroxy-5ß-Verbindungen[23,24].

Wie aus dem Biosyntheseschema hervorgeht, besitzen die meisten der Blutsteroide eine 3ß-Δ^5- oder eine 3-Keto-Δ^4-Struktur. Alle Androstane sollten in Stellung 3 und 17, alle Pregnane in Stellung 3 und 20 sauerstoffsubstituiert sein. Bisher sind nur wenige Ausnahmen davon bekannt geworden[64].

Die vorliegende Arbeit bestätigt diese Befunde. Als Hauptkomponente der Steroidsulfatfraktion des Blutes wurde, wie nicht anders zu erwarten war, das Dehydroepiandrosteron gefunden, das ja bereits von der Nebennierenrinde als Sulfat sezerniert wird.

Der größte Teil der Steroide, soweit ihre Konfiguration eindeutig bestimmt werden konnte, besitzt eine 3ß-Δ^5-Struktur. Steroide mit gesättigter Struktur konnten auch identifiziert werden, allerdings in geringer Menge. Die Fraktion der unkonjugierten Steroide enthielt neben Dehydroepiandrosteron fast nur Metabolite des Progesterons, des Vorläufers der Corticosteroide.

Androstane, Metabolite der Corticosteroide und Derivate des Dehydroepiandrosterons, liegen größtenteils im Blut als Sulfate vor. Es kann sogar zu schweren Stoffwechselstörungen kommen, wenn die Konzentration der freien Androstane im Blut erheblich ansteigt (z.B. "Etiocholanolonfieber")[24].

2. Anmerkung zur Auswertung der Glaskapillargaschromatogramme und Massenspektren

Die Reaktionsbedingungen bei der Derivatisierung mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluor-acetamid (MSTFA) müssen genau eingehalten werden, da bei erhöhter Temperatur oder nach längerem Stehen der Probe eine schwer zu kontrollierende Enolisierung der Steroidketone abläuft, wobei die Steroide, die eine 3-Keto-Δ^4-Struktur besitzen, wesentlich schneller enolisieren als die übrigen Steroidketone.

Hydroxylgruppen in Stellung 11ß und in Stellung 17α werden nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden mit diesem Reagenz noch nicht trimethylsilyliert. Aus diesem Grunde konnten Steroidketone, die zusätzlich in der 11ß- oder in der 17α-Stellung hydroxyliert sind, bei dieser Derivatisierung nicht aufgefunden werden.

Dies trifft auch für Steroidketone wie Progesteron, Adrenosteron und 4-Androsten-3,17-dion und andere zu, soweit sie überhaupt in diesem Trennungsgang, der für hydroxylierte Steroide ausgearbeitet worden ist, erfaßt wurden. Falls diese Ketone Enole bilden, sind die Massenspektren nur sehr schwer auszuwerten.

Die Ketone lassen sich in die Methoxime überführen und massenspektrometrisch identifizieren[106]. Diese Art der Derivatisierung bleibt einer späteren Untersuchung überlassen.

Fast alle Massenspektren der Trimethylsilylether zeichnen sich durch Abspaltung von einem oder mehrerer Trimethylsilanolmoleküle (90 Masseneinheiten) je nach Anzahl der trimethylsilylierten Hydroxylgruppen am Steroidgerüst aus. Seltener beobachtet man die Abspaltung von 89 ME, das dem Verlust eines Trimethylsiloxyradikals entspricht. Dem Verlust eines Moleküls Trimethylsilanol schließt sich im allgemeinen die Abspaltung eines Methylradikals (15 ME) an, in den meisten Fällen verliert auch das Molekülion ein Methylradikal.

Diese immer wiederkehrenden Abspaltungen von 90, 15 und 105 Masseneinheiten werden bei der Interpretation der Massenspektren nicht weiter erwähnt.

Wenn die Massenspektren isomerer Verbindungen, wie beispielsweise der 3,16,17-Trihydroxy-5-androstene, nahezu identisch sind, wird in diesen Fällen nur ein Spektrum abgebildet.

Zur Identifizierung der Massenspektren der Steroidtrimethylsilylether wurde eine Sammlung von ungefähr 500 Spektren angelegt, die teilweise aus der Literatur übernommen wurden und zum anderen Teil in unserer Arbeitsgruppe gemessen wurden. Eine weitere Kartei, in der Schlüsselbruchstücke und M^+-X-Abspaltungen von Steroiden mit der entsprechenden Literatur geordnet sind, ergänzt diese Sammlung.

Anschließend an diese Messung in der Kombination Glaskapillargaschromatograph-Massenspektrometer wurde von jeder Fraktion ein zweites Glaskapillargaschromatogramm aufgenommen, um so wenigstens halbquantitative Aussagen machen zu können. Die quantitative Erfassung der Steroide ist sehr problematisch, da man immer wieder Schwankungen beobachtet. Die Abweichungen können bis zu 20 % betragen.

In einem dritten Glaskapillargaschromatogramm wurden unter Zusatz von Kohlenwasserstoffen Retentionsindices ermittelt, weil nur eine Kombination von Massenspektren und Retentionsindices bei vielen isomeren Verbindungen eine eindeutige Charakterisierung erlaubt. Die Messung der Retentionsindices wurde nur dann eingesetzt, wenn die Massenspektren der Steroidtrimethylsilylether keine eindeutige Konfigurationsermittlung zuließen.

Aus den Massenspektren ist es nämlich in vielen Fällen nur möglich, die Positionen der Hydroxylgruppen am Ringsystem, nicht aber ihre Konfiguration zu ermitteln. Da sich die Retentionszeiten von Steroiden, deren Hydroxylgruppen die gleichen Positionen besetzen, aber unterschiedliche Konfiguration aufweisen, deutlich im Glaskapillargaschromatogramm unterscheiden[107,108], wurden dem aus Blut isolierten Steroidgemisch nach der Derivatisierung Steroidtrimethylsilylether bekannter Struktur zugesetzt.

Die Koinjektion mit Steroidtrimethylsilylethern hat den Vorteil, daß die Auswertung der Chromatogramme von nahezu unvermeidlichen Meßschwankungen unabhängig ist. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die notwendige häufige Wiederholung der Messungen, um in den verschiedenen Glaskapillargaschromatogrammen die Steroide eindeutig zuordnen zu können. Die Retentionsindices der Steroidtrimethylsilylether wurden auf die unverzweigten Kohlenwasserstoffe $C_{24}H_{50}$ und $C_{32}H_{66}$ bezogen. Der Fehler bei der Bestimmung der Retentionsindices beträgt annähernd 0,5 %.

3. Glaskapillargaschromatogramme der einzelnen Fraktionen und Interpretation der Massenspektren

Die Steroide wurden nach der Derivatisierung einer Analyse in einer Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kopplung unterworfen. Zur Trennung der Steroide wurden Kombinationsgeräte, die entweder mit Glaskapillarsäulen oder mit gepackten Säulen ausgerüstet waren, eingesetzt. Alle verwendeten Säulen waren mit SE-30 belegt. Beide Kombinationsgeräte wurden zur Registrierung der Massenspektren an einen Rechner angeschlossen.

Die Konzentration der Blutsteroide in 50 ml Plasma reicht noch aus, um die Steroide an einer GC-MS-Kopplung mit gepackter Säule zu untersuchen und noch auswertbare Massenspektren zu erhalten. Dagegen ist die Konzentration der Liquorsteroide so gering, daß für ein entsprechendes Resultat mindestens 2-3 l Liquor nötig wären.

Eine Glaskapillarsäule trennt auch noch Steroide, die einen Unterschied in ihren Retentionsindices von 5-10 Einheiten aufweisen. Beispielsweise werden 3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten (I= 2632) und 3ß,17ß-Dihydroxy-5α-androstan (I= 2638) an einer Glaskapillarsäule noch getrennt. An einer gepackten Säule fallen aber bereits Verbindungen in einem Peak zusammen, deren Retentionsindices sich um 20 Einheiten unterscheiden.

3.1 Monosulfatfraktionen

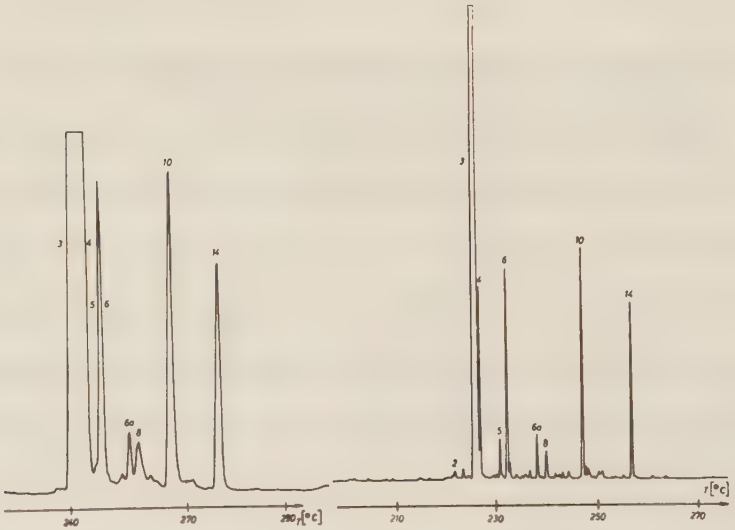


Abb.: 15 a+b

Abb. 15 zeigt eine enzymatisch verseifte Monosulfatfraktion aus 180 ml Blutplasma eines Mannes.

Von dieser Fraktion wurden zwei Gaschromatogramme aufgenommen, eines an einer gepackten und eines an einer Glaskapillarsäule. Peak 3 und 4 und Peak 5 und 6 konnten an gepackten Säulen nicht mehr aufgetrennt werden, aber es gelang eine Trennung von Peak 6a und 8.

Dieses Beispiel zeigt, welche Steroidgemische an gepackten Säulen noch trennbar sind. Enthalten die Gemische mehr Verbindungen wenig unterschiedlicher Retentionszeiten, gelingt eine Trennung an gepackten Säulen nicht mehr.

Die in den Gaschromatogrammen angezeigten Peaks sind mit Laufzahlen 1-15 versehen, die nach Häufigkeit der auftretenden Steroide in den Gaschromatogrammen bestimmt werden, die Festlegung ist aber willkürlich. Verbindungen mit derselben Laufzahl (ohne Index a, b, c ....) entsprechen in allen Gaschromatogrammen denselben 15 Steroiden und werden deshalb nicht in jeder Tabelle aufgeführt. Laufzahlen mit Index a, b, c ... können in jedem Chromatogramm andere Peaks charakterisieren, mögliche Übereinstimmungen sind zufällig.

Die angezeigten Peaks entsprechen den in der Tabelle aufgeführten Steroiden. Zusätzlich werden die relativen Retentionsindices der Steroidtrimethylsilylether und der Vergleichsverbindungen angegeben, die an einer Glaskapillarsäule gemessen wurden.

Tabelle 3

Nr.	Name	MG	Ret. index	Ret. inde Vergl.
2	3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-on	362	2472	
3	3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on	360	2526	2525
4	3ß-Hydroxy-5α-androstan-17-on	362	2544	
5	Enol von 3	432	2610	
6	3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten	434	2632	
6a	3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-on	388	2725	
8	3ß,16α-Dihydroxy-5-androsten-17-on +	448	2762	2764
10	3ß,20α-Dihydroxy-5-pregnen +	462	2858	2860
14	3ß,17α,20α-Trihydroxy-5-pregnen +	478	3017	3020

+ Diese Steroide wurden zusätzlich durch Koinjektion von entsprechenden Steroidtrimethylsilylethern gaschromatographisch identifiziert.

Erklärungen zu den Abkürzungen im Kopf der Tabellen:

MG = Molekulargewicht

Ret. index = relativer Retentionsindex

Ret. index Vergl. = relativer Retentionsindex des Vergleichssteroids

Massenspektren der Steroidtrimethylsilylether der in Tabelle 3 aufgeführten Steroide

(Die Massenspektren werden den Laufzahlen der Steroide nach abgebildet).

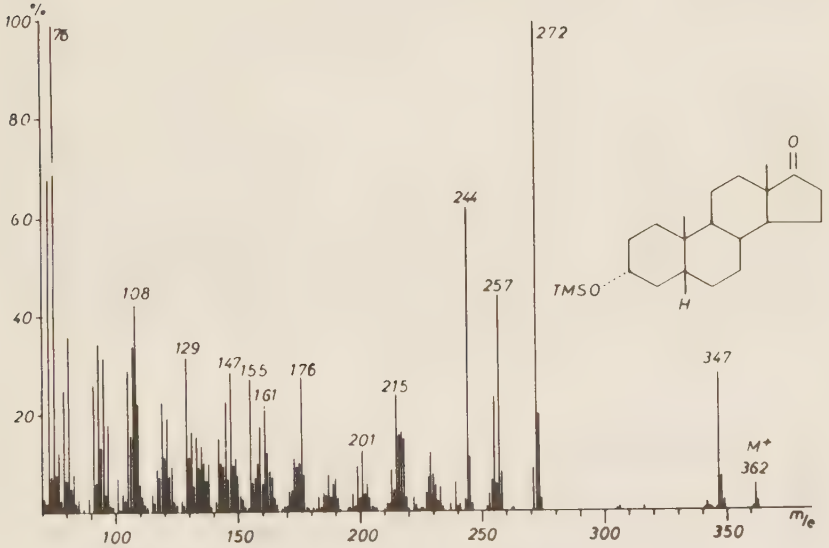
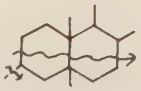


Abb.: 16 Massenspektrum des 3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-ons (Etiocholanolon), Peak 2

m/e	Bruchstücke	Lit.
362	M^+	109
244	272-28 (Verlust von CO, C-Atom 17 oder $CH=CH_2$)	110
215	M^+ -(C-15, C-16, C-17)	111,109
176	Ringe C, D und C-6	109
161	Ringe A, B und C-11, -TMSOH	

m/e	Bruchstücke	Lit.
155		
147	Ringe A und B, -TMSOH	
129	$(CH_3)_3$ $Si\overset{+}{O}$=CH-CH=CH_2, C-1 bis C-2	112-114
108	Ring A und C-6, -TMSOH	114

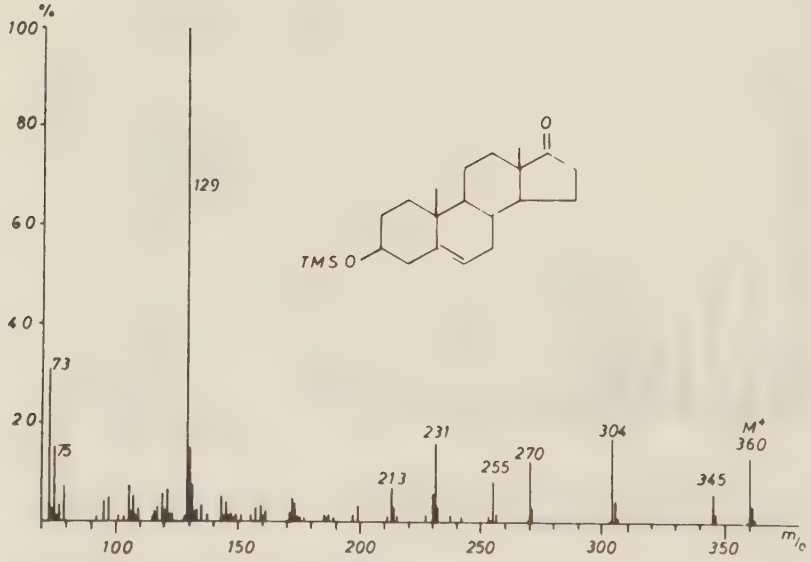


Abb.: 17 Massenspektrum des 3ß-Hydroxy-5-androsten-17-ons (Dehydroepiandrosteron), Peak 3

m/e	Bruchstück	Lit.
360	M^+	114
304	M^+ -56, (C-15 bis C-17)	109
231	M^+ -129	112,115,116
213	231-18 (-H_2O)	
129	$(CH_3)_3$ $Si\overset{+}{O}$=CH-CH=CH_2,	112-114

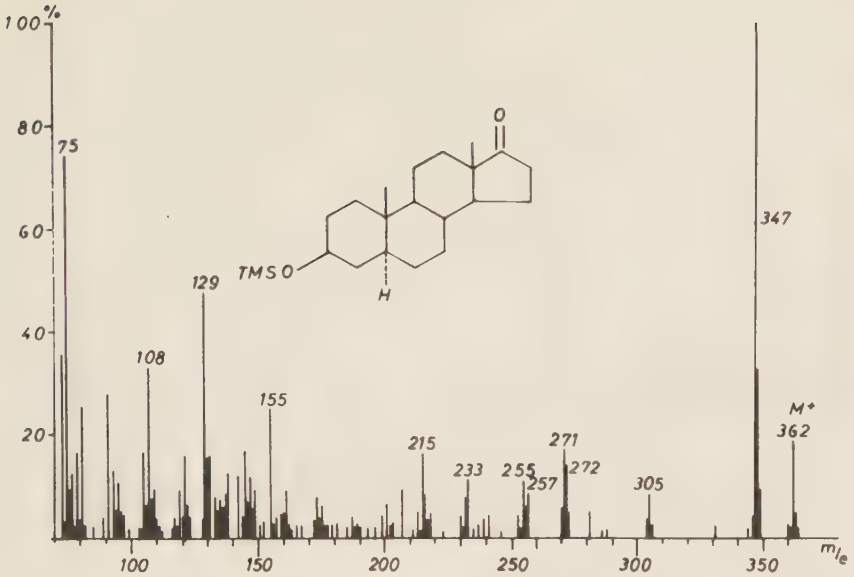
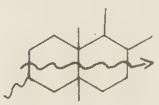


Abb.: 18 Massenspektrum des 3ß-Hydroxy-5α-androstan-17-ons (Epiandrosteron), Peak 4

m/e	Bruchstück	Lit.
362	M^+	109
305	M^+ -57, -(C-15 bis C-17)	117,118
255	M^+ -(89+18)	
233	M^+ -129	112,115,116
215	M^+ -(57+90)	
155		
129	$(CH_3)_3$ $Si\overset{+}{O}$=CH-CH=CH_2	112-114
108	Ring A und C-6, -TMSOH	114

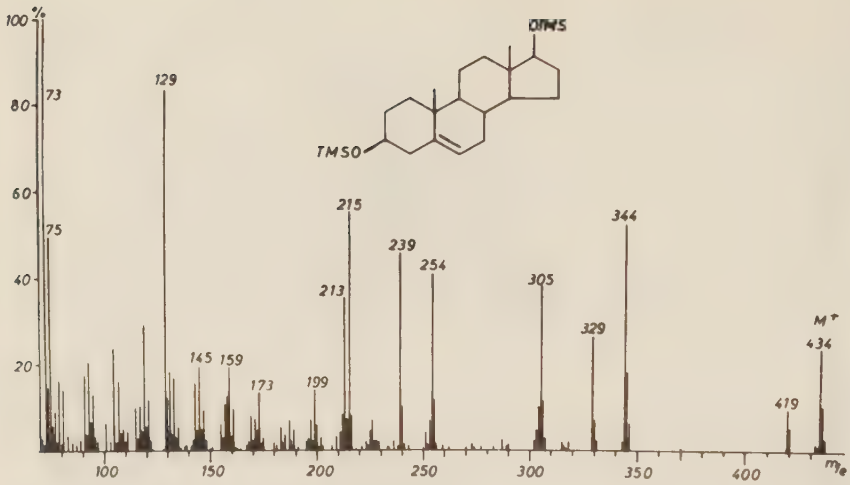


Abb.: 19 Massenspektrum des 3ß,17ß-Dihydroxy-5-androstens, Peak 6

m/e	Bruchstück	Lit.
434	M^+	109
305	M^+ -129	112,115,116
254	M^+ -180	
239	M^+ -(180+15)	
215	M^+ -(129-90)	
213	M^+ -131	119
159	Ringe A, B und C-11, -TMSOH	
145	Ringe A und B, -TMSOH	
129	$(CH_3)_3 \overset{+}{S}i=CH-CH=CH_2$	112-114

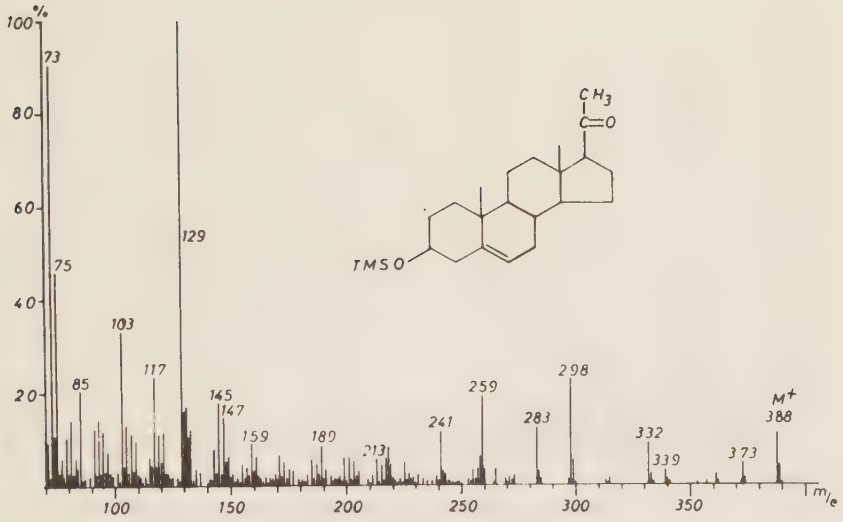


Abb.: 20 Massenspektrum des 3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-ons (Pregnenolon) Peak 6a

m/e	Bruchstück	Lit.
388	M^+	120
332	M^+ -56, -(C-19 bis C-21)	121
259	M^+ -129	112-114
241	259-18 (H_2O)	
145	Ringe A und B, -TMSOH	
129	$(CH_3)_3$ $Si\overset{+}{O}$=CH-CH=CH_2, C-1 bis C-3	112-114
103	$(CH_3)_3$ $Si\overset{+}{O}$=CH_2	

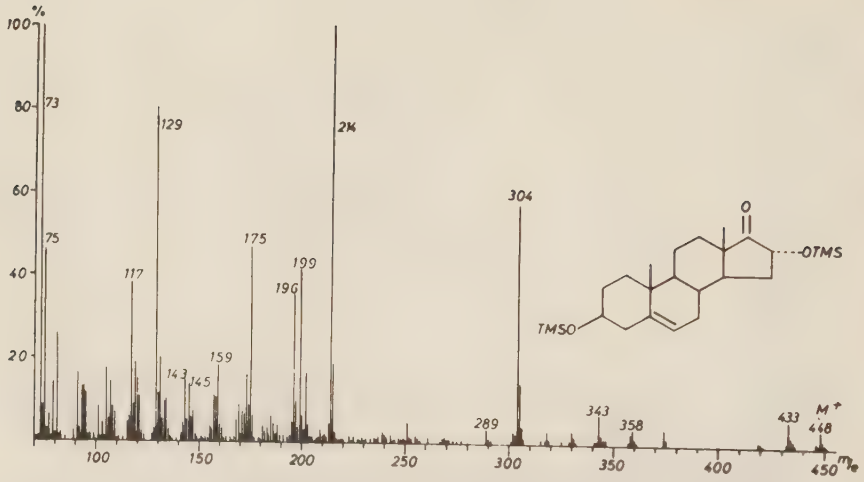
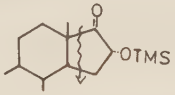
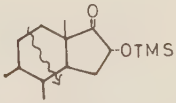


Abb.: 21 Massenspektrum des 3ß,16α-Dihydroxy-5-androsten-17-ons (16α-Hydroxydehydroepiandrosteron), Peak 8

m/e	Bruchstück	Lit.
448	M^+	109
304	M^+ -114, 	119,122,123
289	304-15	
214	304-90	
199	289-90	
196		124
175	Ringe A, B, C-11 und C-12, -TMSOH	
159	Ringe A, B und C-11, -TMSOH	
129	$(CH_3)_3$ $Si\overset{+}{O}$=CH-CH=CH_2	112-114

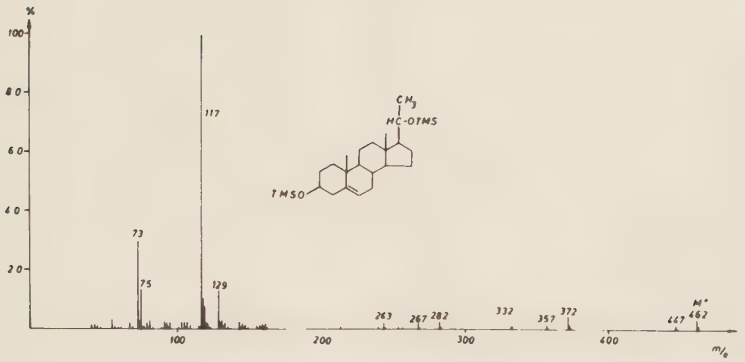


Abb.: 22 Massenspektrum des 3ß,20α-Dihydroxy-5-pregnens, Peak 10

m/e	Bruchstück	Lit.
462	M^+	52,109
282	M^+ -180	
267	M^+ -(180+15)	
129	$(CH_3)_3$ $\overset{+}{Si}$=CH-CH=CH_2	
117	$(CH_3)_3$ $\overset{+}{Si}$=CH-CH_3, C-20 C-21	52,125,126

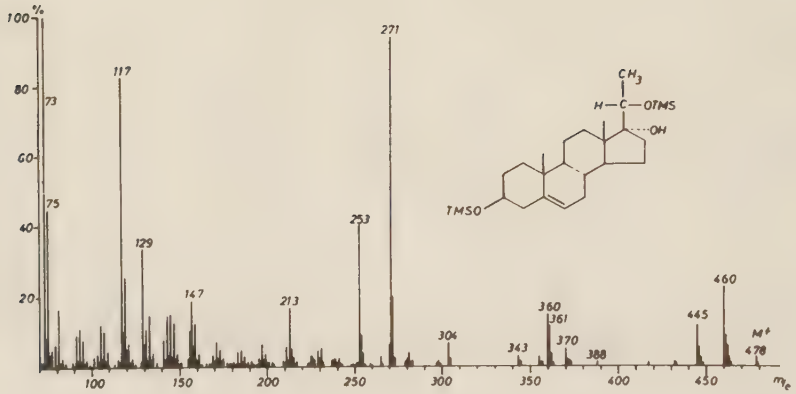
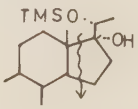


Abb.: 23a Massenspektrum des 3ß,17α,20α-Trihydroxy-5-pregnens, Peak 14

m/e	Bruchstück	Lit.
478	M^+	127
460	M^+ -18 ($-H_2O$, OH-Gruppe in Stellung 17)	
445	460-15	
370	460-90	
361	M^+ -117	128
360	M^+ -118	129
343	361-18	
304	M -179, 	

m/e	Bruchstück	Lit.
271	361-90	
253	271-18	
213	304-89	
147	Ringe A und B, -TMSOH	
129	$(CH_3)_3\ Si\overset{+}{O}=CH-CH=CH_2$	
117	$(CH_3)_3\ Si\overset{+}{O}=\dot{C}H-CH_3$	52,125,126, 128

Wird die Hydroxylgruppe in Stellung 17 bei längerer Einwirkung des MSTFA (8 Tage) trimethylsilyliert, ändert sich die Bruchstückbildung. Das Molekül spaltet jetzt bevorzugt 117 und dann 90 Masseneinheiten ab:

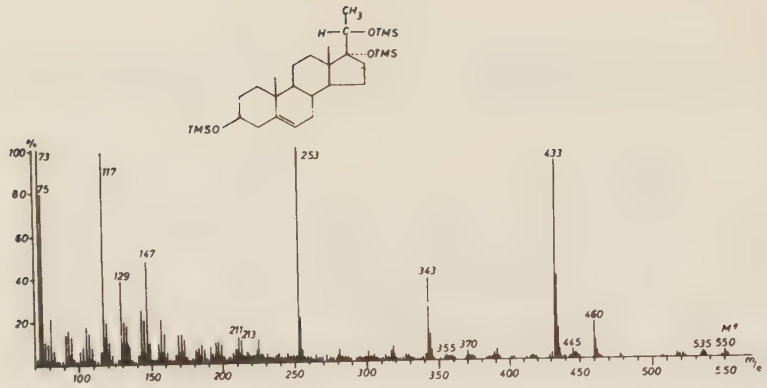


Abb.: 23b Massenspektrum des 3ß,17α,20α-Trihydroxy-5-pregnens

m/e	Bruchstücke	Lit.
550	M^+	127
433	M^+ -117	128
370	M^+ -180	
355	M^+ -(180+15)	
343	433-90	
253	433-180	
213	Ringe A, B und C	112,130
211	Ringe A, B und C, $-H_2$	130
147	Ringe A u. B, -TMSOH oder $(CH_3)_3\ \overset{+}{S}iO{=}Si(CH_2)_2$	6,122,131
129	$(CH_3)_3\ \overset{+}{S}iO{=}CH-CH{=}CH_2$	112-114
117	$(CH_3)_3\ \overset{+}{S}iO{=}CH-CH_3$	52,125,126

In dieser Monosulfatfraktion konnten 8 Steroide identifiziert und Peaks in den Gaschromatogrammen zugeordnet werden, die als Blutkomponenten bereits bekannt sind.

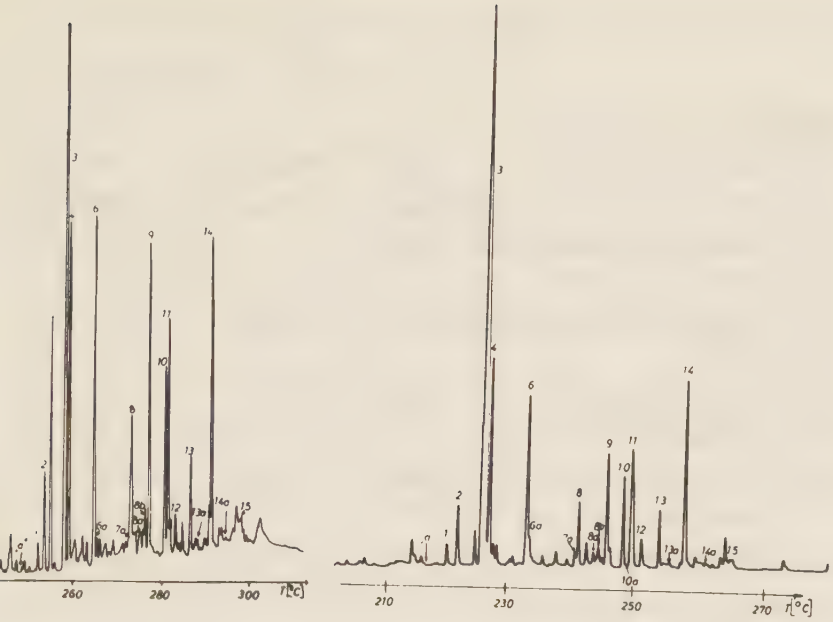


Abb.: 24 a+b

Die Glaskapillargaschromatogramme in Abb. 24 zeigen eine enzymatisch verseifte Monosulfatfraktion, die aus einem Liter Plasma erhalten wurde, das von männlichen und weiblichen Spendern stammte.

In Abb. 24 a ist das Gaschromatogramm des Kopplungsgerätes dargestellt, in Abb. 24 b das entsprechende Chromatogramm, das an einem Einzelgerät aufgenommen wurde.

Die Zusammenstellung dieser Gaschromatogramme soll zeigen, in welchem Maße es möglich ist, Steroide, die mit einem Kombinationsgerät identifiziert wurden, Peaks in einem Chromatogramm, das mit einem anderen Gerät aufgenommen wurde, zuzuordnen.

Tabelle 4

Nr	Name	MG	Ret.ind.	Ret.ind. Ref.
"a"	3α-Hydroxy-5-androsten-17-on	360	2428	2428
1	3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on	362	2446	
6a	3ß,17ß-Dihydroxy-5α-androstan	436	2638	2638
7a	3,16-Dihydroxy-5-androsten-17-on	448	2748	
8a	Hydroxyandrostendion	374	2798	
8b	3,20-Dihydroxy-5-pregnanon	550	2810	
9	3,16,17-Trihydroxy-5-androsten	522	2820	
"10a"	3,16,17-Trihydroxyandrostan	524	2867	
11	3ß,16α,17ß-Trihydroxy-5-androsten +	522	2878	2880
12	3,16,20-Trihydroxy-5-pregnen	550	2902	
13	3ß,17α,20α-Trihydroxy-pregnan	480	2948	
13a	6(?),20-Dihydroxy-4-pregnen-3-on	476	2983	
14a	x,x,20-Trihydroxy-pregnenon	494	3050	
15	3ß-Hydroxy-5-cholesten	458	3134	

+ Zusätzliche Identifizierung durch Koinjektion

Massenspektren der Steroidtrimethylsilylether der in Tabelle 4 aufgeführten Steroide:

Spurensteroide können bei der Registrierung der Glaskapillargaschromatogramme nicht gefunden werden, da die Peaks zu klein ausfallen. Trotzdem ist ihr Nachweis und die Ableitung einer Teilstruktur möglich, wenn entweder diese Spurensteroide angereichert werden (aufwendige Prozedur) oder die Säulen des Kombinationsgerätes mit hohen Dosen des vollständigen Gemisches belastet werden, so daß auch noch von Spurensteroiden auswertbare Massenspektren erhalten werden können. So konnte auch ein Spektrum des 3α-Hydroxy-5-androsten-17-ons aufgenommen werden, einer als Blutkomponenten unbekannten Verbindung, das aber noch einige andere Verbindungen enthält.

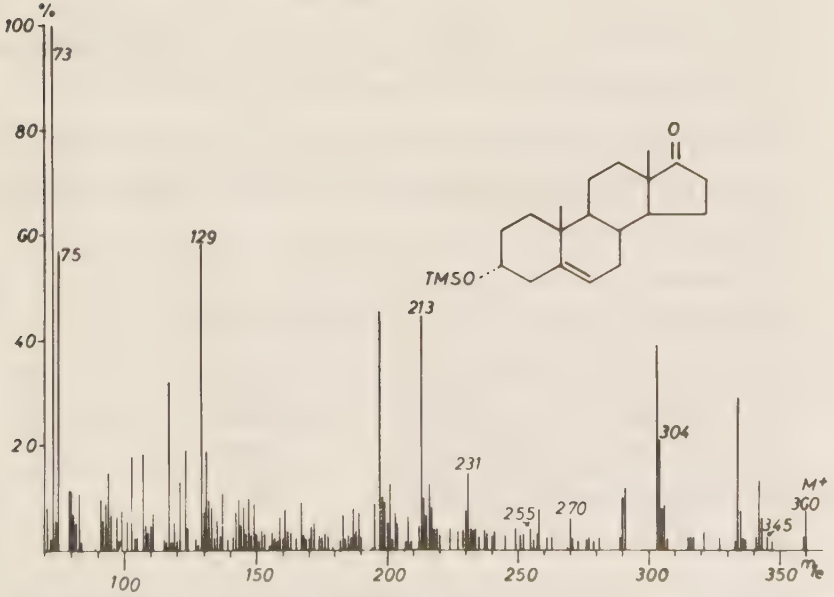


Abb.: 25a Massenspektrum des 3α-Hydroxy-5-androsten-17-ons (aus Blut), Peak "a"

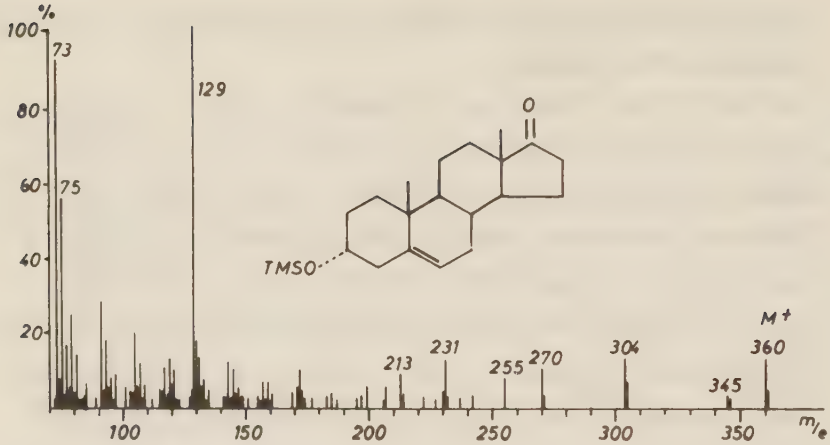


Abb.: 25b Massenspektrum des 3α-Hydroxy-5-androsten-17-ons (Referenzssubstanz)

Da die Spektren der Trimethylsilylether der Isomeren 3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on (Dehydroepiandrosteron), 17ß-Hydroxy-4-androsten-3-on (Testosteron), 17α-Hydroxy-4-androsten-3-on (Epitestosteron) und 3α-Hydroxy-5-androsten-17-on sehr ähnlich sind, waren zur Identifizierung des Steroides Bestimmungen der Retentionsindices der vier Isomeren notwendig:

Tabelle 5

Hydroxyandrostenon	Retentionsindex (SE 30)
3α-Hydroxy-5-androsten-17-on	2428
3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on	2525
17α-Hydroxy-4-androsten-3-on	2593
17ß-Hydroxy-4-androsten-3-on	2643
Peak "a"	2428

Peak "a" konnte anhand des Retentionsindex eindeutig als 3α-Hydroxy-5-androsten-17-on identifiziert werden.

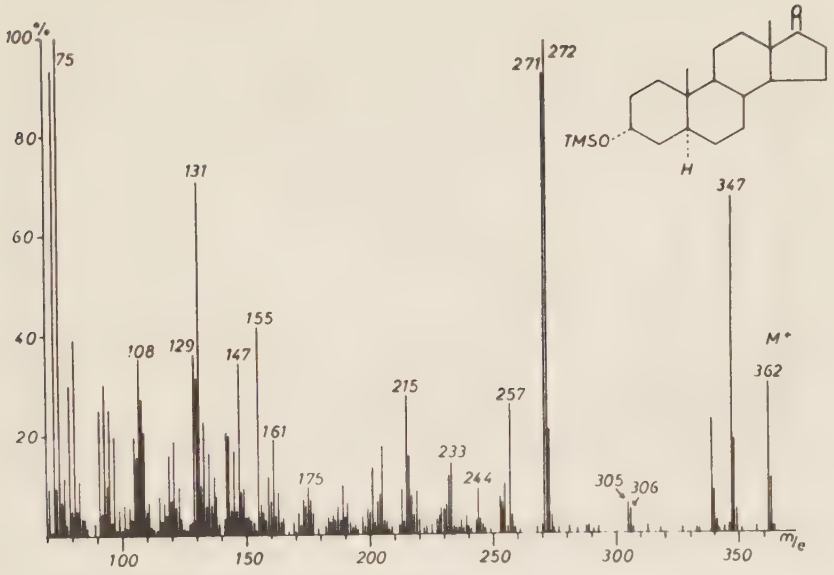


Abb.: 26 Massenspektrum des 3α-Hydroxy-5α-androstan-17-ons (Androsteron), Peak 1

Im Blut konnten drei Isomere mit dem Molekulargewicht 362 identifiziert werden, die bereits als Blutkomponenten bekannt sind: 3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on, 3ß-Hydroxy-5α-androstan-17-on und 3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-on.

Die Massenspektren der Trimethylsilylether, die sich gut voneinander unterscheiden lassen, enthalten Bruchstücke gleicher Massenzahlen, aber unterschiedlicher Intensitäten.

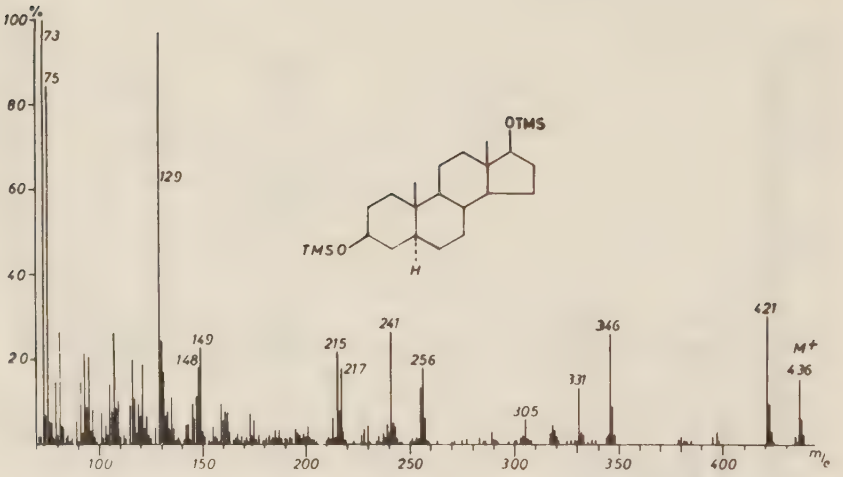


Abb.: 27 Massenspektrum des 3ß,17ß-Dihydroxy-5α-androstans, Peak 6a

m/e	Bruchstücke	Lit.
436	M^+	109
305	M -131, -(C-15 bis C-17)	122
256	M^+ -180	
241	M^+ -(180+15)	
217	M^+ -(129+90)	
215	M^+ -(131+90)	
148	Ringe C, D und C-7, -TMSOH	132
129	$(CH_3)_3 \overset{+}{Si}O=CH-CH=CH_2$	112-114

Ein 3,16,17-Trihydroxyandrostan mit dem Retentionsindex I= 2867 konnte mit der Methode, die Glaskapillarsäulen des Kopplungsgerätes mit einer hohen Dosis des Steroidgemisches zu belasten, identifiziert werden. In dem Glaskapil-

largaschromatogramm wird diese, bisher als Blutinhaltsstoff unbekannte Verbindung, nicht mehr durch einen Peak angezeigt, da ihre Konzentration im Vergleich zu der der Hauptkomponenten zu gering ist. Dem Retentionsindex nach müßte dieses Steroid zwischen Peak 10 und 11 eingeordnet werden.

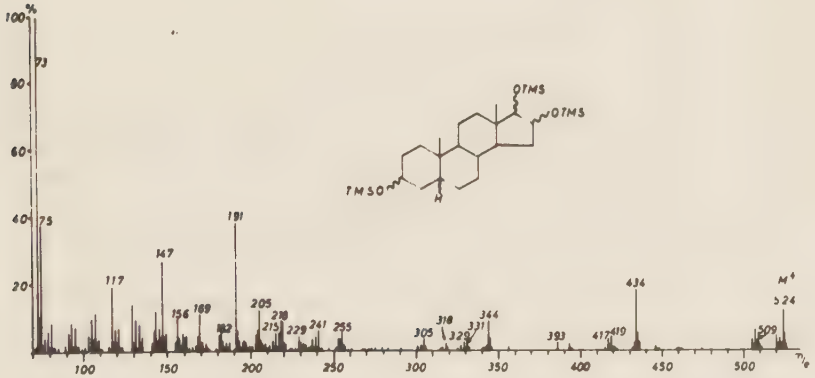
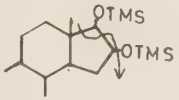


Abb.: 28 Massenspektrum des 3,16,17-Trihydroxyandrostans, Peak "10 a"

m/e	Bruchstücke	Lit.
524	M^+	133,135
393	M^+ -131, -(C-15 bis C-17)	122
344	M^+ -180	
331	M^+ -193 	122,131,134
329	M^+ -(180+15)	
318	C-16, C-17 und 2 x TMSOH	134
305	C-15 bis C-17 und 2 x TMSOH	134

m/e	Bruchstücke	Lit.
255	M^+ -(180-89)	
241	331-90	
229	329-90	
218	Ringe A, B und C	134
215	305-90	134
205	Ringe A, B, C und C-15	
191	$(CH_3)_3$ $\overset{+}{SiO}$=CH-OSi$(CH_3)_3$ bei vicinalen TMSO-Gruppen, C-16	134,135
147	$(CH_3)\overset{+}{SiO}$=Si$(CH_3)_2$ bei vicinalen TMSO-Gruppen	122, 131,134

Da kürzlich in unserem Arbeitskreis 3,16,17-Trihydroxy-androstane von H. Grote präparativ dargestellt wurden[136], standen zur Messung von Retentionsindices einige Isomere zur Verfügung. Die Konfiguration des im Blut identifizierten 3,16,17-Trihydroxyandrostanes konnte anhand der Retentionsindices der Referenzsubstanzen noch nicht geklärt werden. Legt man der Auswertung nur das Massenspektrum zu Grunde, könnte es sich um das 3ß,16α,17ß-Trihydroxy-5α-androstan handeln.[137]

Tabelle 6

3,16,17-Trihydroxyandrostan	Retentionsindex (SE 30)
5α - ααß	2800
5α - ßαß	2892
5ß - ßßß	2712
5ß - ßαß	2778
5ß - ααß	2788
5ß - αßß	2830
Peak "10 a"	2867

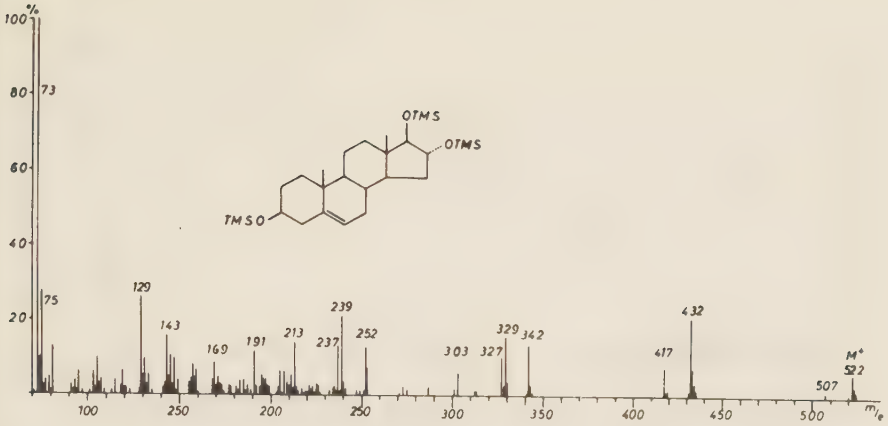


Abb.: 29 Massenspektrum des 3ß,16∝,17ß-Trihydroxy-5-androstens, Peak 11.

m/e	Bruchstücke	Lit.
522	M^+	122,131
342	M^+ -180	
329	M^+ -(90+103)	
327	M^+ -(180+15)	
303	M^+ -(129+90)	
252	M^+ -270	
239	329-90	
237	M^+ -(270+15)	
213	303-90	
191	$(CH_3)_3$ $Si\overset{+}{O}$=CH-OSi$(CH_3)_3$, C-16	134,135
169	Ring D, -TMSOH von C-16	
129	$(CH_3)Si\overset{+}{O}$=CH-CH=CH_2	112-114

Dieses Massenspektrum ist mit dem, das von Peak 9 erhalten wurde, nahezu identisch. Die Isomeren könnten lediglich durch die Retentionsindices unterschieden werden.

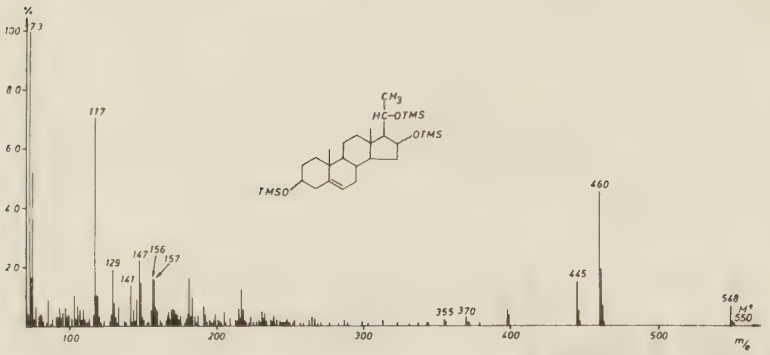


Abb.: 30 Massenspektrum des 3,16,20-Trihydroxy-5-pregnens, Peak 12,

m/e	Bruchstücke	Lit.
550	M^+	
548	Verunreinigung	
370	$M^+ -180$	
355	$M^+ -(180+15)$	
157	C-15, C-16, C-17, C-20	125
156	und C-21, -TMSOH	125
147	Ringe A und B, -TMSOH	6
141	156-15	
129	$(CH_3)_3 \overset{+}{Si}O=CH-CH=CH_2$	
117	$(CH_3)_3 \overset{+}{Si}O=CH-CH_3$ C-20 und C-21	52,125,126,128

Dieses Steroid ist bisher als Blutkomponente noch nicht bekannt. Alle übrigen Peaks in dem Spektrum stammen offenbar von Begleitstoffen.

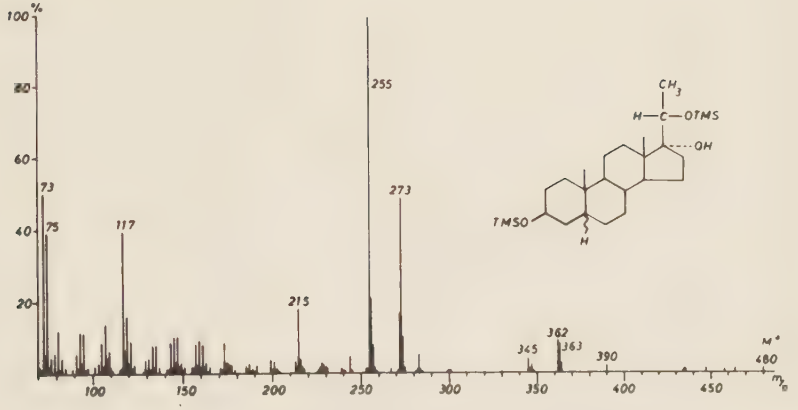


Abb.: 31 Massenspektrum des 3ß,17α,20α-Trihydroxypregnans, Peak 13

m/e	Bruchstücke	Lit.
480	M^+	138
363	M^+ -117	128
362	M^+ -118	129
345	363-18 (H_2O)	
273	363-90	
255	273-18	
215	Ringe A, B und C, -TMSOH	139
117	$(CH_3)_3 \overset{+}{Si}O=CH-CH_3$, C-20 und C-21	52,125,120,128

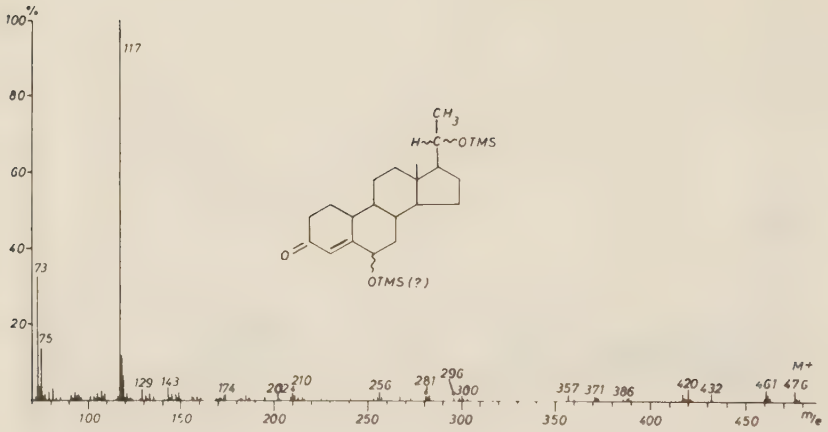


Abb.: 32 Massenspektrum des 6(?),20-Dihydroxy-4-pregnen-3-ons, Peak 13a,

m/e	Bruchstücke	Lit.
476	M^+	138
432	M^+ -44	
420	M^+ -56, -(C-1 bis C-3)	140
296	M^+ -180	
281	M^+ -(180+15)	
117	$(CH_3)_3 \overset{+}{Si}O=CH-CH_3$	52,125,126

Dieser Strukturvorschlag, der sich auf einige massenspektrometrische Zuordnungen stützen kann, ist lediglich eine Annahme. Leider standen zur Messung von Retentionsindices noch keine Vergleichsverbindungen zur Verfügung, da eine entsprechende Diplomarbeit in unserem Arbeitskreis erst kürzlich begonnen wurde. Verbindungen dieses Typs sind als Blutkomponenten nicht bekannt, aber polyfunktionelle Pregnene, die in Stellung 6 eine Hydroxylgruppe tragen[95-97].

Abb.: 33

Dieses Chromatogramm stellt ebenfalls eine enzymatisch verseifte Monosulfatfraktion dar, die aus 40 ml Plasma einer Frau gewonnen wurde.

Die in der Einzelprobe zusätzlich identifizierten Steroide sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 7

Nr	Name	MG	Ret.ind.	Ret.ind. Ver.
7	3ß-Hydroxy-5α-androstan 11,17-dion	448	2654	2652
14a	unidentifiziertes Pregnan		3074	

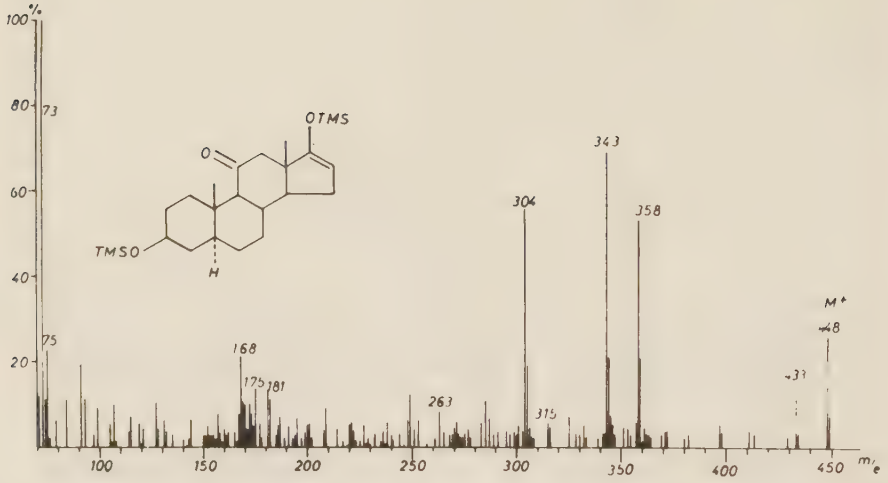


Abb.: 34 Massenspektrum des 3ß-Hydroxy-5α-androstan-11,17-dions

m/e	Bruchstücke	Lit.
448	M^+	138
304	M^+ -144, -(C-1 bis C-4)	
249	Verschmutzung	
182	Ring D und C-12	
168	Ring D	

Die Verbindung liegt als Di-trimethylsilylether vor: Die Ketogruppe in Stellung 17 wurde enolisiert.

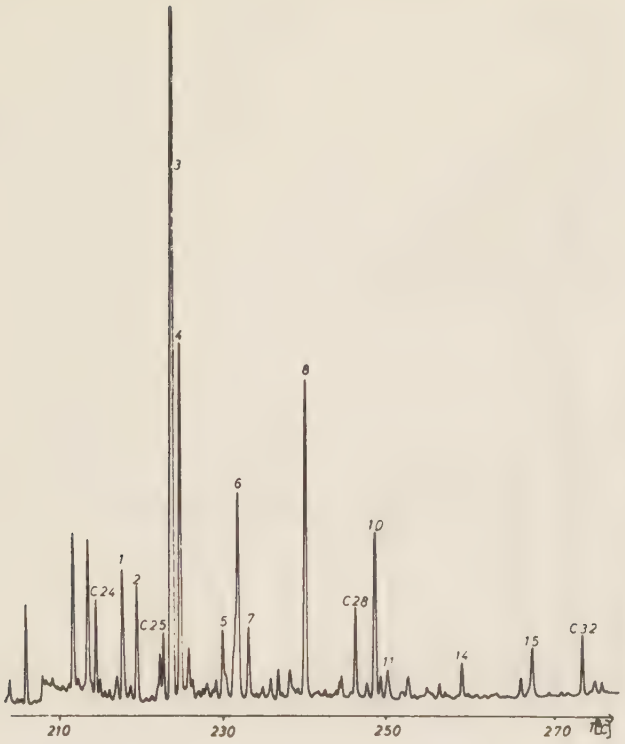


Abb.: 35

Dieses G_1askapillargaschromatogramm zeigt ebenfalls enzymatisch verseifte Blutsteroide eines Mannes, die aus 250 ml Plasma gewonnen wurden. Dieser Probe wurden zur Messung der Retentionsindices Kohlenwasserstoffe zugesetzt.

Abb.: 36

In Abb. 36 ist ein weiteres Gaschromatogramm einer Monosulfatfraktion, die aus 250 ml Plasma eines Mannes gewonnen werden konnte, reproduziert.

Tabelle 8

Nr	Name	MG	Ret.ind.	Ret.ind. Ref.
7a	Verunreinigung aus dem Kohlenwasserstoffgemisch			
7b	3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-on	388	2725	
11a	20α-Hydroxy-4-pregnen-3-on	388	2902	2900

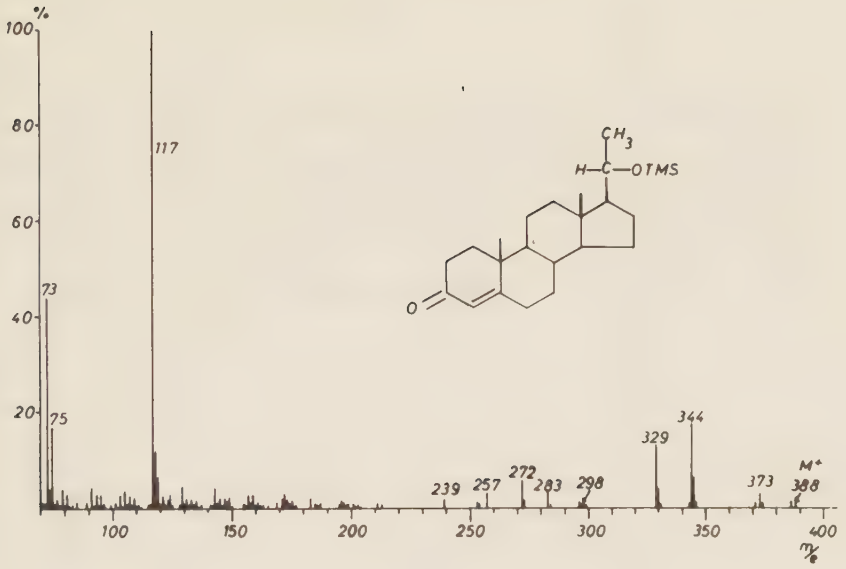


Abb.: 37 Massenspektrum des 20α-Hydroxy-4-pregnen-3-ons, Peak 11a

m/e	Bruchstücke	Lit.
388	M^+	
344^+	M^+ -44, -(C-1 bis C-3)	
329	344-15	
272	M^+ -116	
257	272-15	
239	329-90	
117	$(CH_3)_3 \overset{+}{Si}=CH-CH_3$, C-20 und C-21	52,125,126

+ Von diesem Bruchstück wurde mit der Referenzverbindung "peak matching" durchgeführt; als Bruttoformel ergab sich $C_{22}H_{36}OSi$, Molekulargewicht 344,2537.

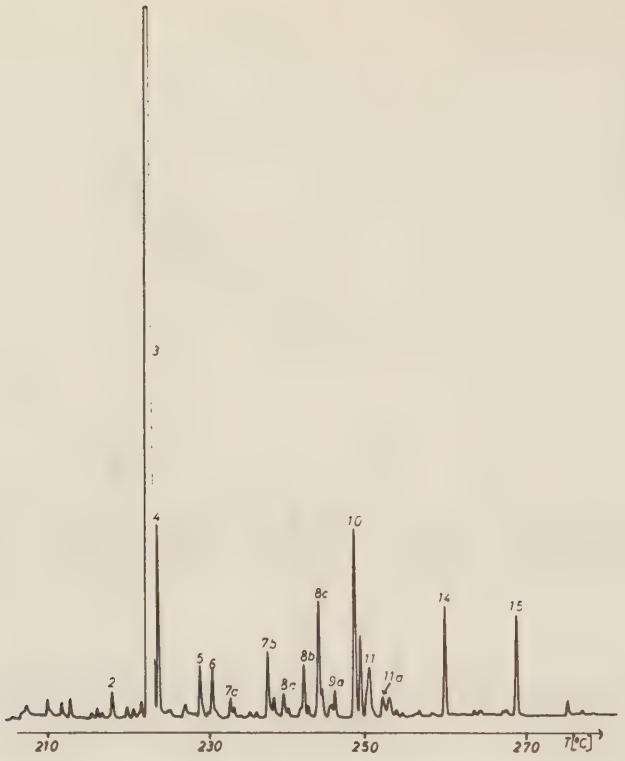


Abb.: 38 Steroide einer Monosulfatfraktion aus 250 ml Plasma einer Frau

Tabelle 9

Nr	Name	MG	Ret.ind.	Ret.ind. Ref.
7a	3,7-Dihydroxy-5-androsten-17-on	448	2670	
7b	3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-on	388	2722	
8a	3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion	374	2750	
8b	unident. Pregnan		2782	
8c	3,20-Dihydroxypregnan	464	2803	
9a	20α-Hydroxy-5α-pregnan-3-on	390	2816	2818
11a	20α-Hydroxy-4-pregnen-3-on	388	2904	2900

Diese Fraktion enthält in Stellung 7 sauerstoffsubstituierte Steroide,die relativ selten auftreten[76]. Es kann ausgeschlossen werden, daß es sich um Artefakte des Dehydroepiandrosterons handelt, da alle Aufarbeitungen in der gleichen Weise durchgeführt wurden.

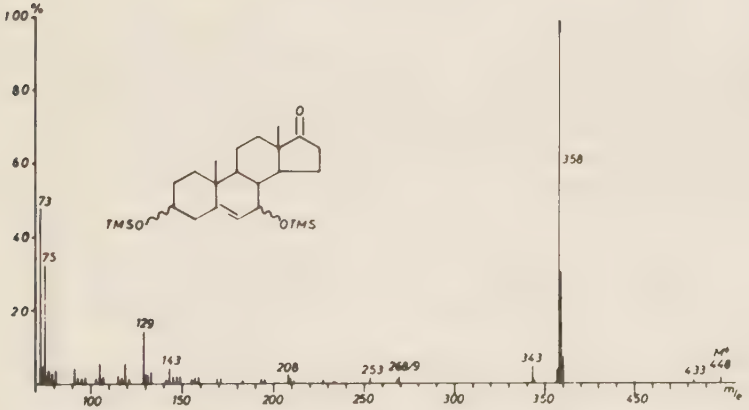
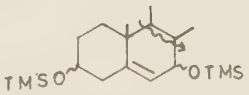


Abb.: 39 Massenspektrum des 3,7-Dihydroxy-5-androsten-17-ons, Peak 7a

m/e	Bruchstücke	Lit.
448	M^+	141
268	M^+ -180	
253	M^+ -(180+15)	
208	-TMSOH, 	
129	$(CH_3)_3 \overset{+}{Si}O=CH-CH=CH_2$	112-114

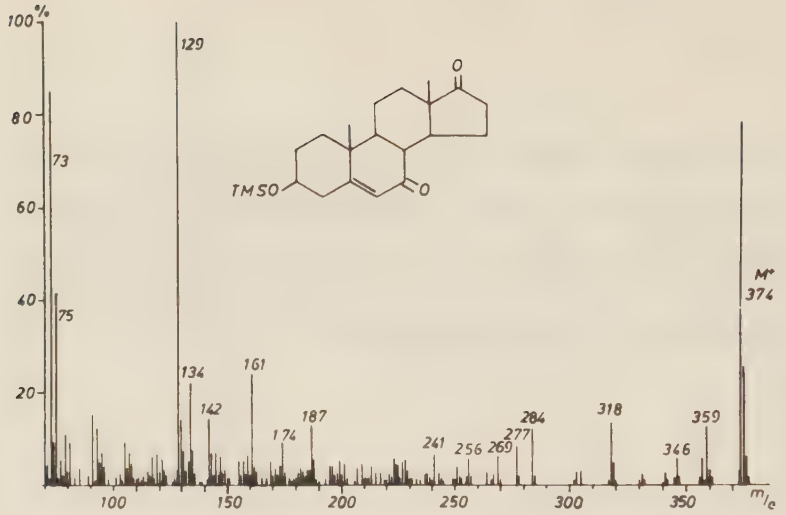
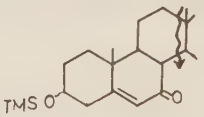
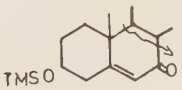


Abb.: 40 Massenspektrum des 3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dions, Peak 8a

m/e	Bruchstücke	Lit.
374	M^+	
346	M^+ -28	
318	M^+ -56	117,118
277		
269	M^+ -(90+15)	
264	Ringe A, B und C-11	
256	346-90	
251	Ringe A und B	
241	269-28	
187	277-90	
174	264-90	142
161	251-90	142
142	C-1 bis C-4	

m/e	Bruchstücke	Lit.
134	-TMSOH, 	142
129	$(CH_3)_3\overset{+}{S}i\overset{\cdot}{O}=CH-CH=CH_2$	112-114

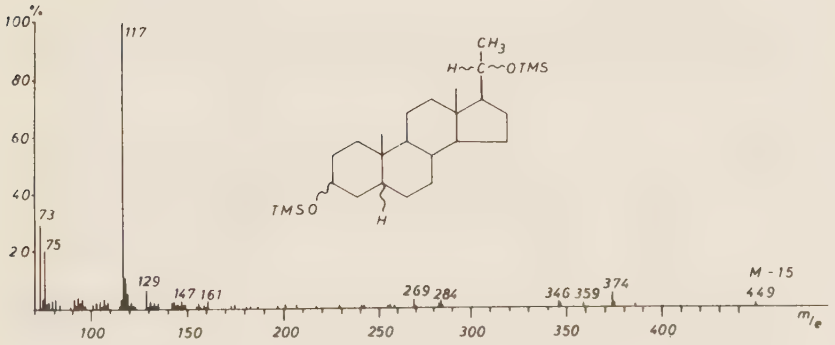


Abb.: 41 Massenspektrum des 3,20-Dihydroxypregnans, Peak 8b, Molekulargewicht 464

m/e	Bruchstücke	Lit.
449	$M^+ -15$	M^+:126
347	$M^+ -117$	128
346	$M^+ -118$	129
284	$M^+ -180$	
269	$M^+ -(180+15)$	
129	$(CH_3)_3\ \overset{+}{S}i\overset{\cdot}{O}=CH-CH=CH_2$	
117	$(CH_3)_3\ \overset{+}{S}i\overset{\cdot}{O}=CH-CH_3$	52,125,126

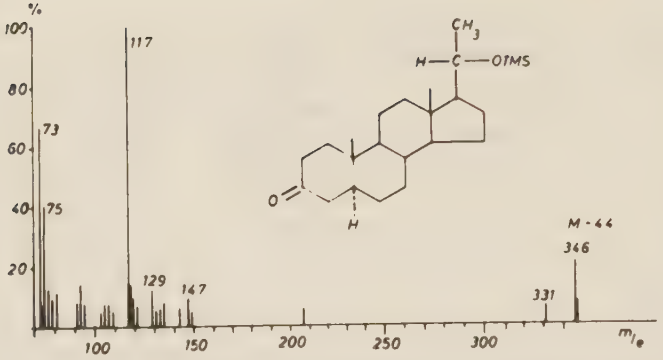


Abb.: 42 Massenspektrum des 20α-Hydroxy-5α-pregnan-3-ons, Peak 11a, Molekulargewicht 390

m/e	Bruchstücke	Lit.
346	M^+ -44	
331	346-15	
117	$(CH_3)_3$ $Si\overset{+}{O}$=CH-CH_3, C-20 und C-21	52,125,126

Dieses Steroid ist als Blutinhaltsstoff noch nicht bekannt, auch entsprechende Isomere sind noch nicht beschrieben worden.

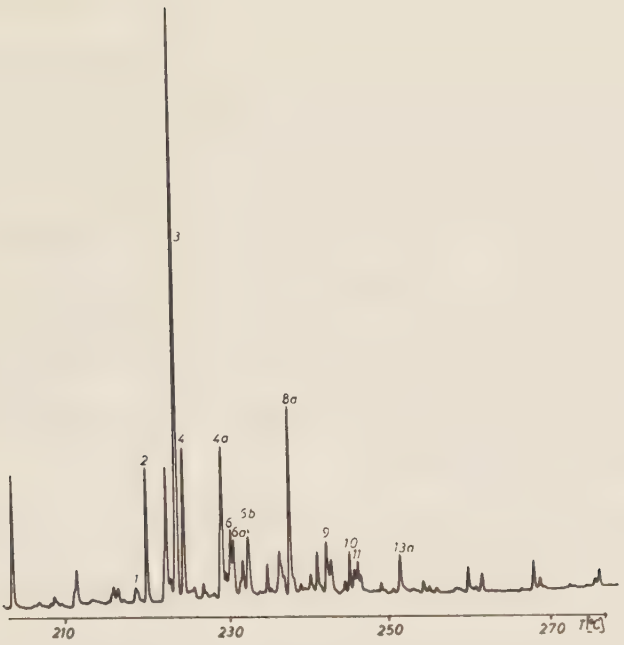


Abb.: 43 Glaskapillargaschromatogramm der Steroide der Monosulfatfraktion von 100 ml Plasma einer Frau

Tabelle 10

Nr	Name	MG	Ret.ind.	Ret.ind. Ref.
4a	3,7-Dihydroxy-5-androsten-17-on	448	2614	
6a	3ß,17ß-Dihydroxy-5α-androstan	436	2638	2638
6b	3,7-Dihydroxy-5-androsten-17-on	448	2672	
8a	3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion	374	2744	
13a	Tetrahydroxypregnanon	654	2966	

Diese Monosulfatfraktion weist ein völlig anomales Steroidprofil auf. Diese Probe und alle, die derselben Blutkonserve entstammen, enthielten eine beträchtliche Menge von sauerstoffsubstituierten Androstanen in Stellung 7, die in solchen Mengen bisher nur bei Metabolismusuntersuchungen von Dehydroepiandrosteron und Testosteron in Leberhomogenaten[143,144], Placenta-[145] und Hautproben [146] und in Tumorgeweben [147] gefunden worden war. In keiner weiteren Blutkonserve wurden so viele 7-sauerstoffsubstituierte Steroide gefunden. Zwei Isomere des 3,7-Dihydroxy-5-androsten-17-on konnten identifiziert werden. Als Blutinhaltsstoff ist bisher nur das 3ß,7 -Dihydroxy-5-androsten-17-on bekannt.

Die beiden zuletzt beschriebenen Steroidmonosulfatfraktionen, in denen Steroide gefunden wurden, die in der Position 7 eine Sauerstoffsubstitution tragen (Abb. 38 und Abb. 43), stammten aus Blut von Frauen, aber es kann aus zwei Befunden keine Geschlechtsabhängigkeit nachgewiesen werden.

Die 7-hydroxylierten Steroide sind Metaboliten des Dehydroepiandrosterons:

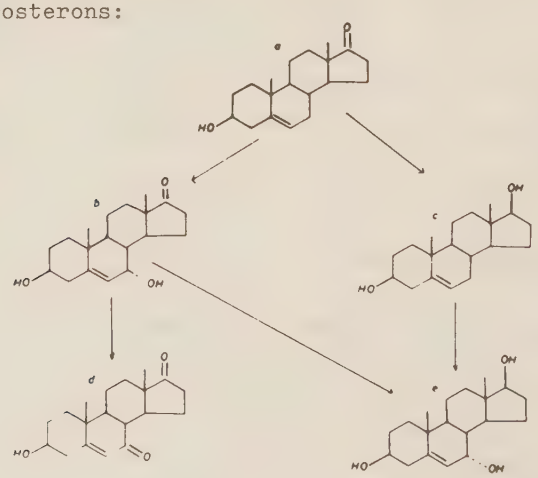


Abb.: 44

Erläuterungen zu Abb. 44

a) 3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on
"Dehydroepiandrosteron"

b) 3ß,7α-Dihydroxy-5-androsten-17-on

c) 3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten

d) 3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion
"7-Ketodehydroepiandrosteron"

e) 3ß,17ß-Trihydroxy-5-androsten

Im Zuge dieser Aufarbeitungen wurden zwei Isomere des 3,7-Dihydroxy-5-androsten-17-on, zwei Isomere des 3,7,17-Trihydroxy-5-androstens, (als Blutkomponenten nicht bekannt), 3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion und ein 3,17-Dihydroxy-5-androsten-7-on, (als Blutkomponenten noch nicht bekannt), gefunden.

Alle sieben in dieser Arbeit vorgestellten Glaskapillargaschromatogramme von Monosulfatfraktionen unterscheiden sich voneinander. Bisher lassen sich diese Unterschiede noch nicht befriedigend erklären. Sie scheinen unabhängig von Alter und Geschlecht der Blutspender zu sein. Man kann annehmen, daß die Spender gesund sind, da Blutkonserven der Blutbank zur Analyse verwendet wurden. Außerdem werden regelmäßige Blutspender verpflichtet, sich innerhalb eines Jahres mehrmals sorgfältig untersuchen zu lassen.

Es kann ausgeschlossen werden, daß die Steroide bei jedem Trennungsgang unterschiedlich durch Luftsauerstoff oxidiert oder abgebaut wurden, da alle Aufarbeitungen unter gleichen

Bedingungen durchgeführt wurden. Aus statistischen Gründen ist die Anzahl der aufgearbeiteten Proben noch zu gering, um ein Stoffgemisch, das aus einer so komplexen Körperflüssigkeit stammt, halbquantitativ zu erfassen.

3.2 Disulfatfraktionen

Die Gaschromatogramme der Disulfatfraktionen gleichen in ihrer qualitativen Zusammensetzung denen der Monosulfatfraktionen, zumal häufig Monosulfate in die Disulfatfraktion eingeschleppt wurden.

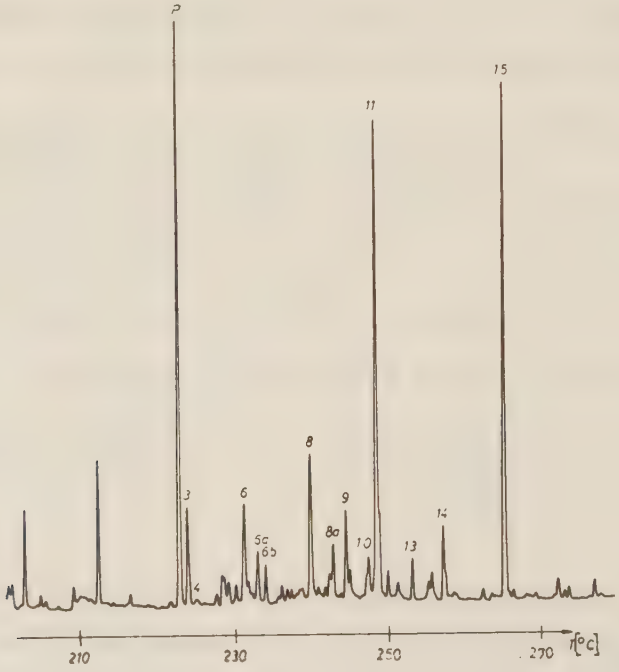


Abb.: 45 Disulfatfraktion aus 250 ml Plasma eines Mannes

Die zusätzlich identifizierten Steroide sind in der Tabelle 11 aufgeführt. Unbekannt waren bisher zwei weitere Isomere des 3,16,17-Trihydroxyandrostans, wovon eines dem Retentionsindex nach mit dem 3α,16α,17ß-Trihydroxy-5α-androstan identisch sein könnte.

Tabelle 11

Nr	Name	MG	Ret.ind.	Ret.ind. Ref.
6a	Dihydroxy-4-androsten-3-on	448	2654	
6b	3,16,17-Trihydroxy-androstan	524	2668	
8a	3,16,17-Trihydroxy-androstan	524	2798	2800

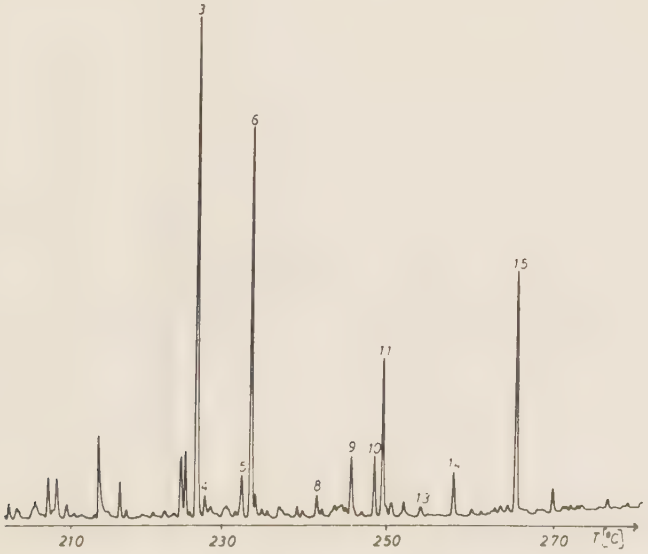


Abb.: 46 Steroidfraktion aus 180 ml Plasma eines Mannes

Diese Disulfatfraktion besitzt qualitativ in etwa die gleiche Steroidzusammensetzung wie die in Abb. 45. In Abb. 46 ist die Hauptkomponente neben eingeschleppten Monohydroxysteroiden (Peak 3,4 und 15) das 3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten. Es ist schwierig, die Disulfate zu Anfang des Trennungsganges nicht zu verlieren, da sie zum Teil mit dem Waschwasser von XAD eluiert werden[101]. In der Fraktion der Abb. 45 wurde das 3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten entweder zu Anfang der Aufarbeitung eluiert oder mit den Monosulfaten zusammen abgetrennt.

Abb.: 47 Steroiddisulfatfraktion aus 40 ml Plasma einer Frau

Dieses Glaskapillargaschromatogramm ist dem in der vorherigen Abbildung in qualitativer und quantitativer Zusammensetzung sehr ähnlich.

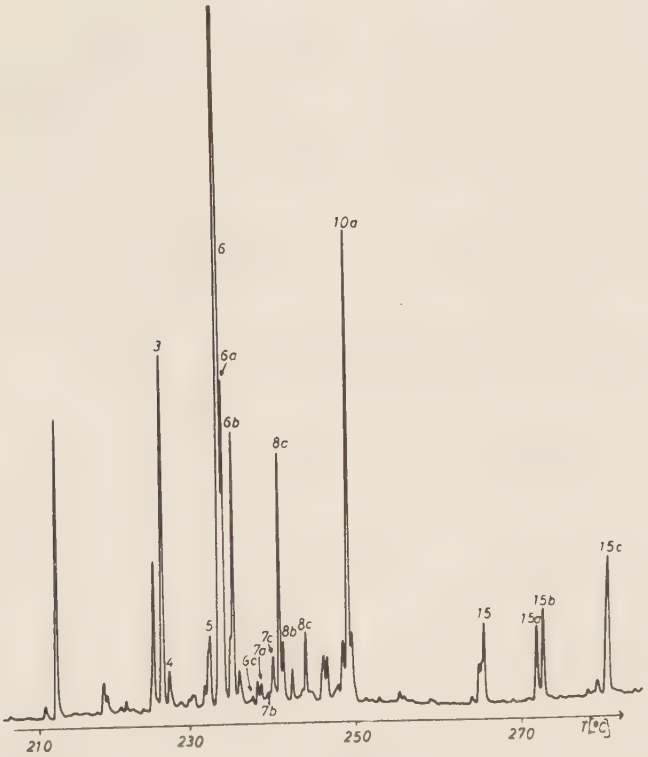


Abb.: 48 Steroiddisulfatfraktion aus 100 ml Plasma einer Frau

Tabelle 12

Nr	Name	MG	Ret.ind.	Ret.ind. Ref.
6a	3ß,17ß-Dihydroxy-5α-androstan	436	2636	2638
6b	3,7,17-Trihydroxy-5-androsten	522	2656	
6c	3,16-Dihydroxy-5-androsten-17-on (Enol)	520		
7a	3,16,17-Trihydroxy-5-androsten	522	2702	
7b	6,17-Dihydroxy-4-androsten-3-on	448	2708	
7c	Dihydroxyandrostanon	450	2729	
8a	3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion	374	2744	
8b	Dihydroxyandrostenon	448		
8c	3,7,17-Trihydroxy-5-androsten	522	2794	
10a	3,17-Dihydroxy-5-androsten-7-on	448	2871	
15a	Trihydroxycholesten	564		
15b	Trihydroxycholesten	564		
15c	3ß-Hydroxy-5-cholesten-7-on	472		

Diese Disulfatfraktion stammt aus derselben Blutkonserve wie die Monosulfatfraktion der Abb. 43. Sie enthält ebenfalls eine beträchtliche Menge Steroide, die in der Stellung 7 sauerstoffsubstituiert sind.

Massenspektren:

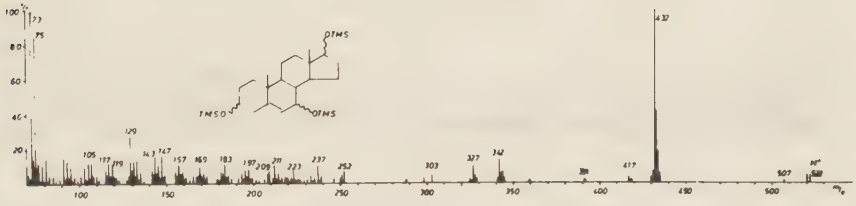


Abb.: 49 Massenspektrum des 3,7,17-Trihydroxy-5-androstens, Peak 6b und 8c

m/e	Bruchstücke	Lit.
522	M^+	138
391	M -131, -(C-15 bis C-17)	119
342	M^+ -180	
327	M^+ -(180+15)	
252	M^+ -270	
237	M^+ -(270+15)	
223	Ringe C und D	148
211	391-180	
129	$(CH_3)_3 \overset{+}{S}i=CH-CH=CH_2$, (C-1 bis C-3)	112-114

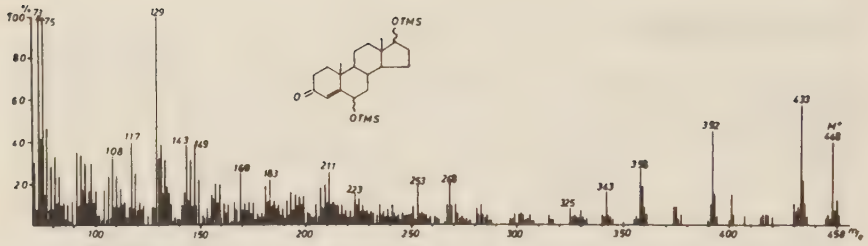
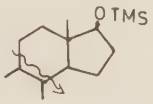


Abb.: 50 Massenspektrum des 6,17-Dihydroxy-4-androsten-3-ons, Peak 7b

m/e	Bruchstücke	Lit.
448	M^+	149
392	M^+ -56, -(C-1 bis C-3)	140
268	M^+ -180	
253	M^+ -(180+15)	
223	Ringe C und D	148
211	Ringe A, B und C	130
197		
183	Ring D und C-12	
129	$(CH_3)_3$ $Si\overset{+}{O}$=CH-CH=CH_2	112-114
117	$(CH_3)_3$ $Si\overset{+}{O}$=CH-CH_3	

Dieses Steroid ist bisher als Blutinhaltsstoff noch nicht bekannt, allerdings ist die Strukturbestimmung nicht ganz sicher.

Abb.: 51 Massenspektrum eines Dihydroxyandrostanons, Peak 7c

m/e	Bruchstücke	Lit.
450	M^+	
421	M^+ -29	
394	M^+ -56	
332	360-28	
317	360-15	
305	394-89	
270	M^+ -180	
255	M^+ -(180+15)	
242	332-90	
227	317-90	
215	305-90	
129	$(CH_3)_3$ $\overset{+}{Si}$=CH-CH=CH_2	52,125,126

Da leider kein Referenzspektrum vorlag, kann die Struktur dieser Verbindung nicht genau bestimmt werden. Dieses Spektrum ist aber deshalb interessant, da Dihydroxyandrostanone als Blutkomponenten sehr selten sind.

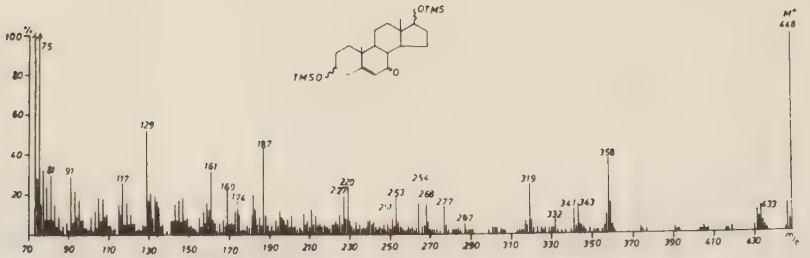
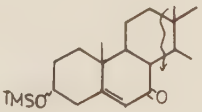


Abb.: 52 Massenspektrum des 3,17-Dihydroxy-5-androsten-7-ons, Peak 10a

m/e	Bruchstücke	Lit.
448	M^+	138
332	M^+ -116	
319	M^+ -129	112,115,116
317	M^+ -131	119
277	M^+ -(C-13 bis C-18)	
268	M^+ -180	
264		
253	M^+ -(180+15)	
251	Ringe A und B	
229	319-90	
227	317-90	
211	Ringe A, B und C, -TMSOH	130
187	277-90	
174	264-90	141
169	Ring D	

m/e	Bruchstücke	Lit.
161	251-90	
129	$(CH_3)_3$ $Si\overset{+}{O}=CH-CH=CH_2$, C-1 bis C-3	112-114
117	$(CH_3)_3$ $Si\overset{+}{O}=CH-CH_3$	

3.3 Sauer verseifte Steroidsulfate

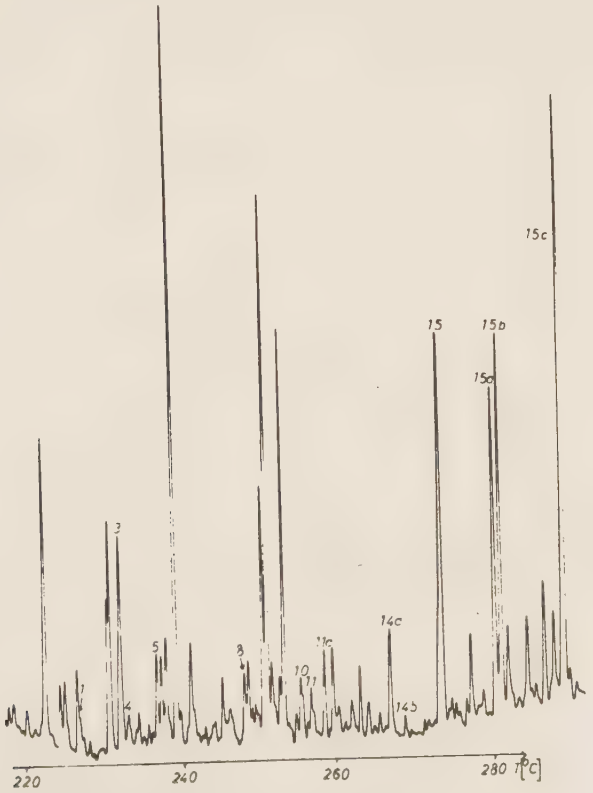


Abb.: 53 sauer verseifte Steroidsulfate aus 250 ml Plasma eines Mannes

Tabelle 13

Nr	Name	MG	Ret.ind.	Ret.ind. Ref.
11a	3 ,16α-Dihydroxy-5-pregnen-20-on	476	2902	
14a	nicht ident. Pregnan		3024	
14b	Corticosteroid		3046	
15a	Trihydroxycholesten	564		
15b	Trihydroxycholesten	564		
15c	3ß-Hydroxy-5-cholesten-7-on	472		

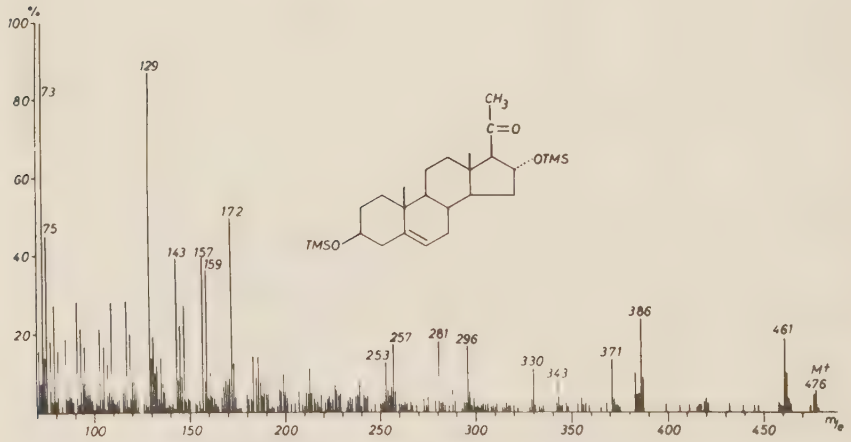


Abb.: 54 Massenspektrum des 3ß,16α-Dihydroxy-5-pregnen-20-ons, Peak 11a

m/e	Bruchstücke	Lit.
476	M^+	150
343	M^+ -(90+43), C-20 u. C-21	

m/e	Bruchstücke	Lit.
330	M^+ -(90+56)	
296	M^+ -180	
281	M^+ -(180+15)	
257	M^+ -(90+129)	
253	343-90	
213	Ringe A, B und C	130
172	C-15, C-16, C-17, C-20 und C-21	151
159	C-16, C-17, C-20 und C-21	114
157	172-15	114
129	$(CH_3)_3 \overset{+}{S}i=CH-CH=CH_2$	112-114

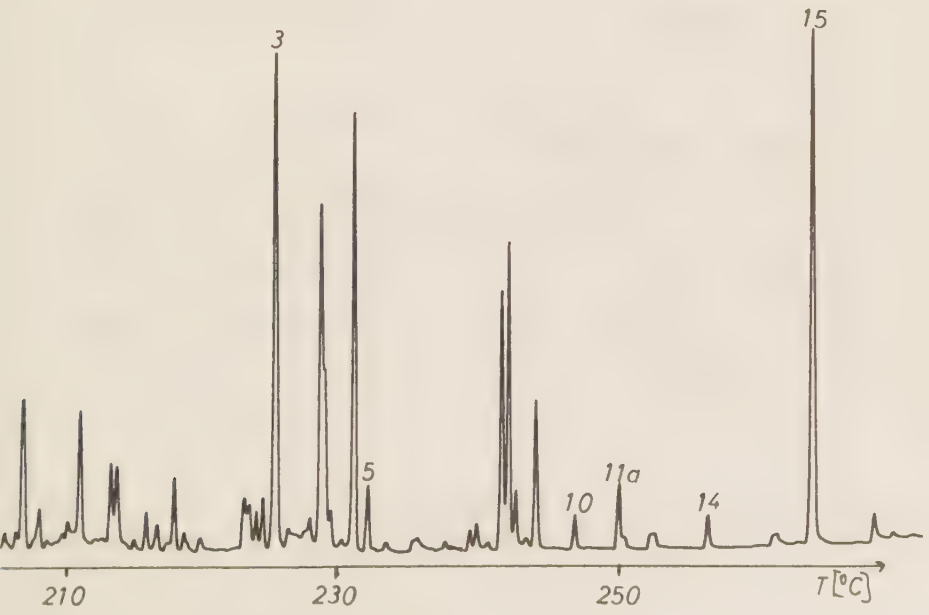


Abb.: 55 sauer verseifte Steroidsulfate aus 180 ml Plasma eines Mannes

Tabelle 14

Nr	Name	MG	Ret.ind.	Ret.ind.
11a	20α-Hydroxy-4-pregnen-3-on	388	2903	2900

Die sauer verseiften Steroidfraktionen zeigten immer unterschiedliche Profile trotz konstanter Aufarbeitung. Nur zu Anfang konnten Blutsteroide nachgewiesen werden, die nicht in der enzymatisch verseiften Fraktion aufgefunden worden waren.

Es scheint sich eher um zufällig unverseifte "Steroidreste" der enzymatischen Verseifung zu handeln. Die letzten Aufarbeitungen enthielten in den sauer verseiften Fraktionen kaum noch Steroide.

3.4 Übrige Steroidsulfate

Es wurden noch einige Steroide als Sulfate identifiziert, die hier keinen Peaks aus Glaskapillargaschromatogrammen zugeordnet werden können, da die Chromatogramme zum Teil sehr viele Verunreinigungen und nicht abgetrennte Begleitstoffe enthielten.

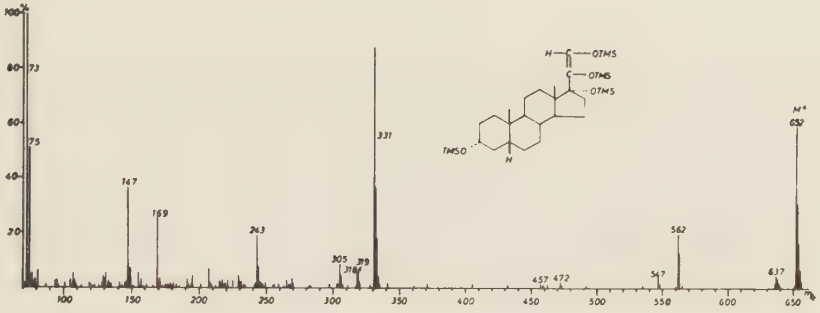
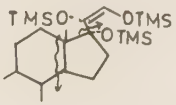


Abb.: 56 Massenspektrum des 3α,17α,21-Trihydroxy-5ß-pregnan-11,20-dions (Tetrahydrocortison)

m/e	Bruchstücke	Lit.
652	M^+	152
472	M^+ -180	
457	M^+ -(180+15)	
332 331	C-15, C-16, C-17, C-20 und C-21 und 3 TMS-Gruppen	153
319 318	C-16, C-17, C-20 und C-21 und 3 TMS-Gruppen	153
305	318-15	
243	332-89	
169		
147	$(CH_3)_3 \overset{+}{Si}{=}Si(CH_3)_2$ (bei vicinalen TMSO-Gruppen)	122,131

Diese Verbindung ist eines der wenigen Corticosteroide, die in dieser Arbeit identifiziert werden konnten. Mit hoher Wahrscheinlichkeit verlieren Corticosteroide bei der Trimethylsilylierung die Seitenkette und werden zu 17-Ketosteroiden abgebaut, sofern sie nicht schon vorher im Trennungsgang verloren gehen.

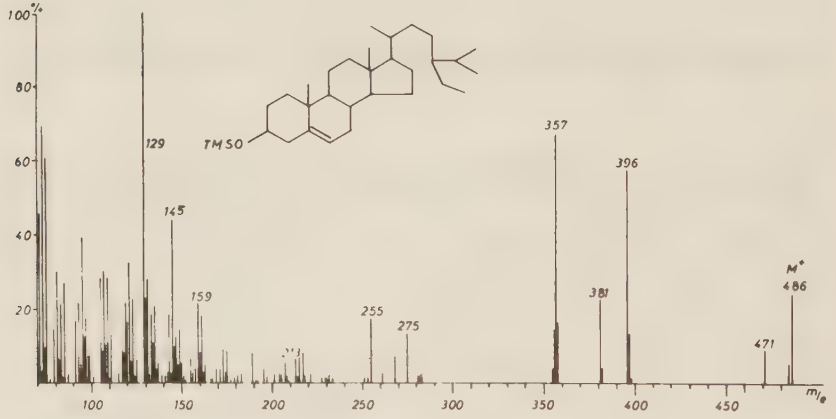


Abb.: 57 Massenspektrum des 24-Ethyl-3ß-hydroxy-5-cholestens, (Sitosterin)

m/e	Bruchstücke	Lit.
486	M^+	154
357	M^+ -129	
275	Ringe C, D und C-20 bis C-24	
159	Ringe A, B und C-12 -TMSOH	

m/e	Bruchstücke	Lit.
145	Ringe A und B, -TMSOH	
129	$(CH_3)_3$ SiO=CH-CH=CH_2	

Sitosterin ist ein Pflanzensterol[155] und wurde durch Nahrungsmittel in das Blut aufgenommen.

3.5 Glucuronidfraktionen

Die Konzentration der Steroidglucuronide ist wesentlich geringer als die der Sulfate. Außerdem zeigen viele Begleitsubstanzen der Steroide ähnliche R_f-Werte wie die Glucuronide und sind daher schwierig abzutrennen. Das bisherige Ergebnis zeigt, daß die Trennschritte durchaus vernünftig sind, obwohl bisher in der angereicherten Steroidfraktion außer Cholesterin nur drei Steroidglucuronide identifiziert werden konnten.

Einige Argumente sprechen dafür, daß wirklich Steroidglucuronide und nicht etwa Sulfate oder freie Steroide identifiziert wurden:

a) Abtrennung der Glucuronide an Sephadex-LH-20

b) Abtrennung der freien Steroide durch Extraktion

c) spezifische Verseifung mit ß-Glucuronidase

Abb.: 58 Glaskapillargaschromatogramm einer enzymatisch verseiften Glucuronidfraktion aus 250 ml Plasma einer Frau

3.6 Fraktion der unkonjugierten Steroide

Der Trennungsgang, der von Sjövall übernommen und stark modifiziert wurde, läßt eine gute Anreicherung der freien Steroide zu, aber alle Begleitstoffe der Steroide konnten noch nicht abgetrennt werden.

Sjövall genügte eine Anreicherung der unkonjugierten Steroide, da er diese Methode für Routineuntersuchungen ausgearbeitet hatte und die Steroide anhand von FIC-Chromatogrammen (Fragment Ion Current) - jetzt SID (Single Ion Detection) und MID (Multible Ion Detektion) - identifizierte. Eine relative Anreicherung von Steroiden genügt nicht, wenn man "Profile" aufnehmen möchte.

Der modifizierte Trennungsgang reichte allerdings, um Spektren von Steroiden, die nahezu frei von Beimengungen waren, zu erhalten.

Die meisten der identifizierten Steroide sind Vorläufer oder Metabolite des Progesterons. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Biosynthese der unkonjugierten Steroide.

Abb.: 59 Glaskapillargaschromatogramm der unkonjugierten Steroide aus 180 ml Plasma eines Mannes

Tabelle 15

Nr	Name	MG	Ret.ind.	Ret.ind. Ref.
13a	11α-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion	402	2930	2928
14a	11(?),20-Dihydroxypregnan-3-on	478	3074	
14b	Pregnanderivat	490(?)	3096	

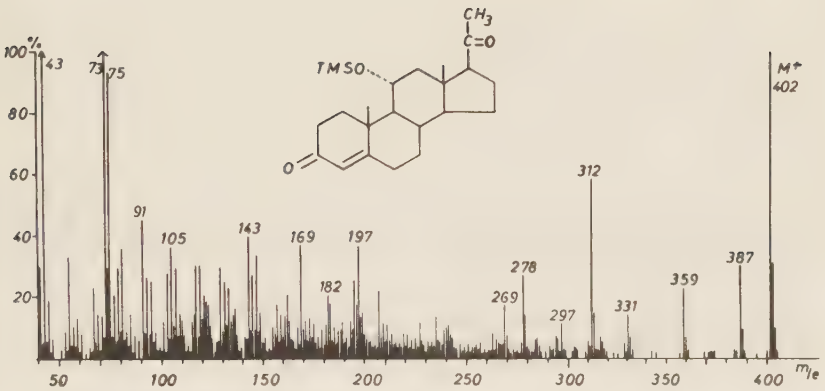


Abb.: 60 Massenspektrum des 11α-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dions, Peak 13a

m/e	Bruchstücke	Lit.
402	M^+	
359	M^+ -43, C-20 und C-21	156,157
331	M^+ -71, C-15, C-16, C-20, C-21	
278	M -124, Ring A	
269	259-90	
43	CH_3-C≡Ö	156,157

Als Blutinhaltsstoff ist das 11ß-Progesteron, aber nicht das 11α-Isomere bekannt. (Das 11ß-Progesteron ließ sich mit MSTFA bei Raumtemperatur nur nach längerem Stehen derivatisieren.)

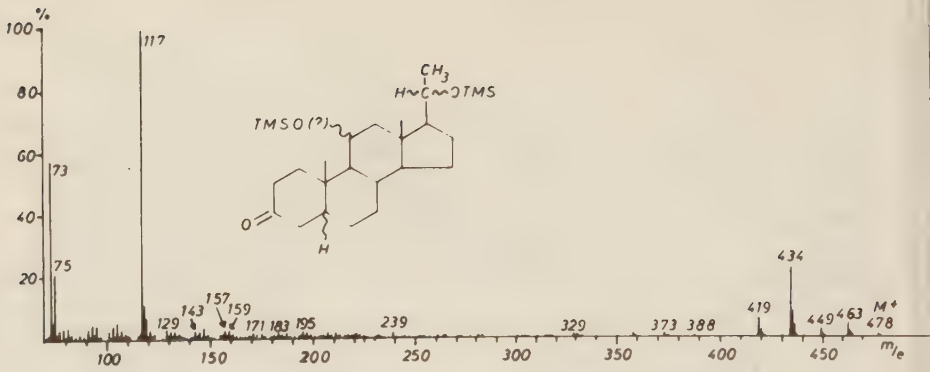


Abb.: 61 Massenspektrum des 11(?),20-Dihydroxypregnan-3-ons, Peak 14 a

m/e	Bruchstücke	Lit.
478	M^+	
449	M^+ -29	
434	M^+ -44	
419	M^+ -(44+15)	
373	M^+ -(90+15)	
329	419-90	
117	$(CH_3)_3\overset{+}{S}iO=CH-CH_3$, C-20 u. C-21	52,125,126

Die Struktur dieses Steroids konnte nicht eindeutig geklärt werden, da kein Referenzspektrum oder Referenzsubstanz zur Verfügung standen. Als gesichert kann die 3-Keto- und die 20-Hydroxystruktur angesehen werden.

3.7 Steroide aus Liquor cerebrospinalis

In der Cerebrospinalflüssigkeit liegen nebeneinander freie Steroide, Cholesterinester und Steroidkonjugate (Sulfate und Glucuronide) vor[56].

Die verschieden gebundenen Liquorsteroide wurden getrennt voneinander untersucht. Zwei Versuche zur Isolierung der Liquorsteroide wurden erfolgreich durchgeführt:

Dehydroepiandrosteron konnte eindeutig als freies Steroid und als Glucuronid nachgewiesen werden. Weiterhin wurde ein Glaskapillargaschromatogramm einer enzymatisch verseiften Sulfatfraktion aufgenommen und die Peaks Steroiden zugeordnet.

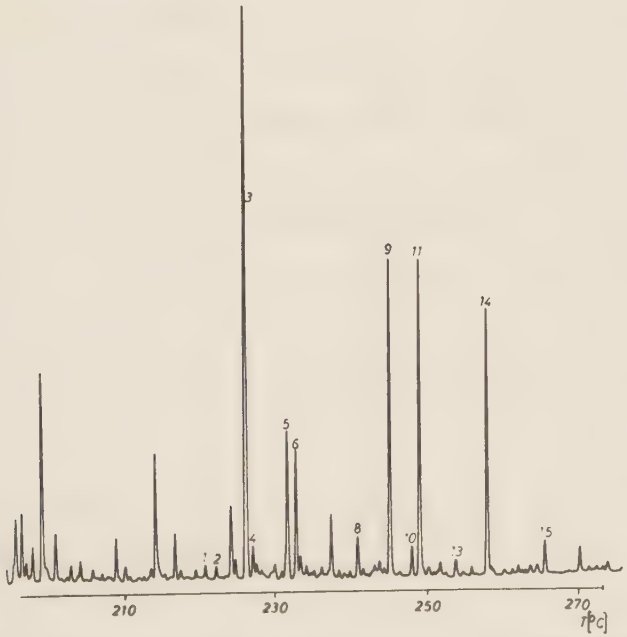


Abb.: 62 Glaskapillargaschromatogramm einer Sulfatfraktion aus 300 ml Sammelliquor

13 Steroide, die bereits bei den Chromatogrammen der Blutsteroide besprochen wurden, konnten den Chromatogrammpeaks zugeordnet werden:

Tabelle 16

Nr	Name	Ret. ind.	Ret. ind. Ref.
1	3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on	2444	
2	3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-on	2470	
3	3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on	2525	2525
4	3ß-Hydroxy-5α-androstan-17-on	2540	
5	Enol von 3	2610	
6	3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten	2628	
8	3ß,16α-Dihydroxy-5-androsten-17-on	2760	2764
9	3,16,17-Trihydroxy-5-androsten	2818	
10	3ß,20α-Dihydroxy-5-pregnen	2862	2860
11	3ß,16α,17ß-Trihydroxy-5-androsten	2880	2880
13	3ß,17α,20α-Trihydroxypregnan	2950	
14	3ß,17α,20α-Trihydroxy-5-pregnen	3017	3020

Tabelle 17

3.8 Zusammenstellung der Steroide, die in dieser Arbeit im menschlichen Blut nachgewiesen werden konnten.

Name	MG (TMS-Ether)	MG (frei)
4-Androsten-3,17-dion		286
3-Hydroxyandrostadien	344	272
3-Hydroxyandrosten	346	274

Name	MG (TMS-Ether)	MG (frei)	
3-Hydroxyandrostadienon	358	286	
3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on (Dehydroepiandrosteron)	360	288	
3α-Hydroxy-5-androsten-17-on	360	288	
3ß-Hydroxy-5α-androstan-17-on (Epiandrosteron)	362	290	
3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on (Androsteron)	362	290	
3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-on (Etiocholanolon)	362	290	
Hydroxyandrostadiendion	372	300	
3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion (7-Ketodehydroepiandrosteron)	374	302	
Dihydroxyandrostenon	376	304	
3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-on (Pregnenolon)	388	316	
20α-Hydroxy-4-pregnen-3-on	388	316	
20α-Hydroxy-5α-pregnan-3-on	390	318	x
11α-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion	402	330	x
3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten	434	290	
3,17-Dihydroxy-5-androsten	434	290	
3ß,17ß-Dihydroxy-5α-androstan	436	292	
3,7-Dihydroxy-5-androsten-17-on (2 Isomere)	448	304	x
3,17-Dihydroxy-5-androsten-7-on	448	304	x
3ß-Hydroxy-5α-androstan-11,17-dion	448	304	
3ß,16α-Dihydroxy-5-androsten-17-on	448	304	

Name	MG (TMS-Ether)	MG (frei)	
3,16-Dihydroxy-5-androsten-17-on	448	304	
6,17-Dihydroxy-4-androsten-3-on	448	304	x
Dihydroxyandrostanon (2 Isomere)	450	306	
3ß,20α-Dihydroxy-5-pregnen	462	316	
3,20-Dihydroxy-5-pregnen	462	316	
3,20-Dihydroxypregnan	464	318	
3ß,16α-Dihydroxy-5-pregnen-20-on	476	332	
6(?),20-Dihydroxy-4-pregnen-3-on	476	332	x
3,20-Dihydroxypregnanon	478	334	
11(?),20-Dihydroxypregnan-3-on	478	334	x
3ß,17α,20α-Trihydroxy-5-pregnen	478	334	
3,17,20-Trihydroxy-5-pregnen	478	334	
3ß,17α,20α-Trihydroxypregnan	480	336	
24-Ethyl-3ß-hydroxy-5-cholesten	486	414	
x,x,20-Trihydroxy-4-pregnen-3-on	494	350	
3ß,16α,17ß-Trihydroxy-5-androsten	522	306	
3,16,17-Trihydroxy-5-androsten (2 Isomere)	522	306	
3,7,17-Trihydroxy-5-androsten (2 Isomere)	522	306	x
3,16,17-Trihydroxyandrostan (3 Isomere)	524	308	x
3,16,20-Trihydroxy-5-pregnen	550	334	x
3,x,21-Trihydroxypregnan	552	336	

Name	MG (TMS-Ether)	MG (frei)
3α,17α,21-Trihydroxy-5ß-pregnan-11,20-dion (Tetrahydrocortison)	652	366
3α,11ß,17α,21-Tetrahydroxy-5ß-pregnan-20-on (Tetrahydrocortisol)	654	368

Die mit einem "x" versehenen Verbindungen sind als Blutkomponenten noch nicht bekannt.

VI. Zusammenfassung

Die Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie wurde zur Analyse isolierter Blutsteroidgemische eingesetzt. Hauptsächlich wurden Glaskapillarsäulen zur Trennung des Steroidgemisches verwendet, da sie in ihrer Trennleistung gepackten Säulen weit überlegen sind. Allerdings kamen auch gepackte Säulen zum Einsatz.

Massenspektrometrisch konnten 52 Blutsteroide, die in 22 Aufarbeitungen isoliert wurden, identifiziert werden, wovon 11 Steroide als Blutinhaltsstoffe bisher noch nicht bekannt waren:

1. 3α-Hydroxy-5-androsten-17-on
2. 20α-Hydroxy-5α-pregnan-3-on
3. 11α-Hydroxy-4-pregnen-3-on
4. 3,7-Dihydroxy-5-androsten-17-on
5. 3,17-Dihydroxy-5-androsten-7-on
6. 3,7,17-Trihydroxy-5-androsten (2 Isomere)
7. 3,16,17-Trihydroxyandrostan (3 Isomere)
8. 3,16,20-Trihydroxy-5-pregnen

Weiterhin konnten drei Steroide identifiziert werden, die bisher als Blutkomponenten ebenfalls nicht bekannt waren, deren Struktur aber nicht eindeutig geklärt werden konnte:

1. 6,17-Dihydroxy-4-androsten-3-on
2. 6,20-Dihydroxy-4-pregnen-3-on,
3. 11,20-Dihydroxypregnan-3-on

Um die massenspektrometrische Analyse der Steroide zu vervollständigen, wurden Retentionsindices von Blutsteroiden und Referenzverbindungen bestimmt. Zusätzlich wurde die gaschromatographische Identifizierung der Steroide durch die Koinjektionsmethode mit Steroidtrimethylsilylethern bekannter Struktur unterstützt.

Da sich die Aufnahme von Glaskapillargaschromatogrammen für eine halbquantitative Erfassung der Steroide mit Ausnahme der Corticosteroide eignet, wurden "Steroidprofile" der verschiedenen Fraktionen zusätzlich an einem Gaschromatographen, der mit Glaskapillarsäulen ausgerüstet war, hergestellt. Diese Steroidprofile können bei Steroidstoffwechselstörungen zur klinischen Diagnose herangezogen werden.

Zur Isolierung von Steroiden aus Blut konnten Aufarbeitungsverfahren aus der Literatur übernommen und modifiziert werden, so daß reine Steroidgemische erhalten wurden.

Die Steroidsulfate, Glucuronide und proteingebundenen Steroide wurden getrennt untersucht. Es stellte sich heraus, daß wesentlich bessere Ergebnisse erzielt werden können, wenn freie Steroide und Konjugate getrennt untersucht werden, als wenn die Steroidkonjugate und sämtliche Begleitstoffe gleich im ersten Aufarbeitungsschritt verseift werden und erst dann ihre Trennung versucht wird.

Die Aufarbeitungsmethode hat sich auch zur Untersuchung von Körperflüssigkeiten auf Steroide bewährt, die dieselbe qualitative Zusammensetzung wie Blutplasma ausfweisen: Versuche zur Isolierung der Steroide aus Liquor cerebrospinalis, die eine noch geringere Konzentration als im Blutplasma (80 µg/100 ml Liquor) aufweisen, konnten erfolgreich mit dem Nachweis von 13 Steroiden abgeschlossen werden.

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L

A. Verwendete Geräte

1. Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kombination

1.1 Die Trennung der Steroidtrimethylsilylether und Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit einem LKB-Gaschromatographmassenspektrometer 2091 mit einem LKB 2130-Datensystem mit PDP-11-05-Computer der Firma Digital Equipment. Ionisierungsenergie 70 eV, der TIC wurde bei 20 eV registriert. 25 m Glaskapillarsäule (Innendurchmesser 0,3 mm, SE-30 - Dünnfilm), Gasdurchfluß: Helium, 2 ml/min, Injektortemperatur 275°C, Säulentemperatur von 120 - 300°C, mit 3°C/min programmiert.

1.2. Zur Analyse der Steroidtrimethylsilylether wurde auch ein CH-7-Massenspektrometer der Firma Varian eingesetzt, Ionisierungsenergie 70 eV. Der Gaschromatograph (Varian Aerograph 1700) ist bei diesem Gerät über einen zweistufigen Biemann-Watson-Separator an das Massenspektrometer gekoppelt. Gasdurchfluß: Helium, 20 ml/min, Injektortemperatur 270°C, Säulentemperatur von 200 - 300°C, mit 6°C/min programmiert. Gepackte Trennsäule mit 3 % SE-30 auf Supelcoport 100/120. Die Kombination wurde mit einem Computer gekoppelt: Spectrosystem 100 MS (Varian Computer 620/L).

2. Gaschromatograph

Die Glaskapillargaschromatogramme und Retentionsindices der Trimethylsilylether wurden an einem Carlo-Erba-2300-Gaschromatographen gemessen. Detektor: FID, Injektortemperatur

275°C, Temperaturprogramm 120 - 300°C, mit 2°C/min programmiert, Dünnfilmglaskapillarsäule (20 m, 0,3 mm Innendurchmesser), nach statischer Methode belegt[158]. Verwendung von Alkaliglas (Hilgenberg-Glas, Malsfeld) Kapillarsäulenziehgerät: Hupe und Busch.

3. Szintillationszähler

Die Szintillationsmessungen wurden mit einem Tri-Carb 3380-Flüssigkeitsszintillationszähler von Packard bei 4°C und einer Zähldauer von 10 min durchgeführt. Als Szintillationslösung wurde in Toluol-Ethanol gelöstes 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und p-Bis- 2-(5-phenyl-oxazolyl) benzol) (POPOP) verwendet. Die Radioaktivität von Tritium wurde gemessen.

B. Isolierung der Steroide aus Plasma

1. Steroidsulfate

1 l Plasma, mit physiologischer Kochsalzlösung auf das 10-fache verdünnt, wurde bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 100 ml/h über eine XAD-Säule (300 g) gegeben. Das Säulenmaterial wurde mit 2 l Wasser entsalzt und die adsorbierten Stoffe mit 1 l Methanol eluiert. Der im Vakuum getrocknete Methanolextrakt wurde an Sephadex-LH-20 (4 g) mit dem Laufmittelsystem Methanol:Chloroform 1 : 1, dem 0,01 Mol NaCl zugesetzt wurde, bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 4 ml/h in drei Fraktionen getrennt. Die Steroid-

glucuronide wurden bei einem Volumen von 0 - 29 ml eluiert, die Steroidmonosulfate von 30 - 65 ml, die Steroiddisulfate von 66 - 250 ml. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden die Mono- und Disulfatfraktionen mit je 20 ml Acetatpuffer, der auf pH 4,7 eingestellt war, versetzt und mit 0,2 ml Helicase ($3 \cdot 10^6$ Roy-Einheiten Sulfatase und $2 \cdot 10^5$ Fishmen-Einheiten ß-Glucuronidase) drei Tage bei 37°C verseift. Die freien Steroide wurden durch dreimalige Extraktion mit je 50 ml Essigester gewonnen.

Die wäßrigen Phasen der Essigesterextraktion wurden vereint und nochmals zur Gewinnung der unverseiften Sulfate über eine XAD-4-Säule (100 g) gegeben. Nach dem Entsalzen (200 ml Wasser) wurde mit 100 ml Methanol eluiert und der Rückstand nach Burstein und Lieberman [103] mit H_2SO_4 acidifiziertem Essigester (20 ml) 24 h bei 39°C behandelt. Nach Neutralisation der Schwefelsäure mit $NaHCO_3$ wurde der Essigester im Vakuum entfernt.

Alle verseiften Fraktionen wurden mit dem Laufmittelsystem Methanol:Chloroform:Wasser 9 : 2 : 1 an DEAP-LH-20 bei einer Durchflußrate von 4 ml/h von Fettsäuren befreit.

Mit demselben Laufmittelsystem wurde Cholesterin von dem sauer verseiften Steroidgemisch an Lipidex^R-5000 (5 g) mit einer Durchflußrate von 5 ml/h abgetrennt.

Jede Probe wurde auf eine in Benzol aufgeschlämmte Kieselgelsäule (200 mg) in dem Laufmittelsystem Benzol:Essigester 95 : 5

aufgetragen. Unpolare Verbindungen konnten mit 30 ml dieses Laufmittels entfernt werden. Nach dem Wechsel des Laufmittels wurden polare Substanzen mit 30 ml Essigester extrahiert. Der Essigesterextrakt wurde in 10 /ul Methanol gelöst, davon wurden 2/3 nach der Trimethylsilylierung zur massenspektrometrischen Analyse in der GC-MS-Kopplung verwendet und 1/3 zur Aufnahme von Glaskapillargaschromatogrammen.

Einige Aufarbeitungen wurden mit 40 ml Plasma beziehungsweise 100 ml und 250 ml durchgeführt. Das Volumen der XAD-4-Säule (es wurde auch XAD-2 verwendet), mit der die Proteine abgetrennt wurden, mußte entsprechend verkleinert werden. Die anderen Trennsäulen wurden nicht geändert.

2. Steroidglucuronide

2.1 Aufarbeitung A

Die Steroidkonjugate wurden nach dem Steroidtrennungsgang an Sephadex aufgetrennt. Die ersten 30 ml enthielten die Glucuronide und Begleitstoffe. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Extrakt in 20 ml Wasser aufgenommen. Die Fette, Fettsäuren, freie Steroide und sonstige Lipide wurden durch eine dreimalige Extraktion mit jeweils 50 ml Ether entfernt.

Das Wasser wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Extrakt mit 20 ml Acetatpuffer (pH 4,7) aufgenommen, mit

0,2 ml ß-Glucuronidase aus E. coli (entsprechend 100 U) versetzt und drei Tage bei 37°C enzymatisch verseift. Die Extraktion der freien Steroide und die weitere Aufarbeitung wurde nach dem Trennungsgang der Steroidsulfate durchgeführt.

2.2 Aufarbeitung B

250 ml Plasma wurden mit dreimal 50 ml Ether ausgeschüttelt, um Fette, Fettsäuren und Cholesterin abzutrennen. Die Glucuronidfraktion wurde nach dem oben beschriebenen Trennungsgang weiter aufgearbeitet.

3. Proteingebundene Steroide

3.1 Aufarbeitung A

100 ml (beziehungsweise 250 ml, 50 ml) Plasma wurden auf das 10-fache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, mit 200 g XAD-4 versetzt und bei 64°C einen Tag im Wasserbad gerührt. Die trübe Lösung wurde zusammen mit dem Adsorberharz in eine Säule gefüllt und bei großer Durchflußrate (keine abreißenden Tropfen mehr) vom XAD-4 abgetrennt. Das Säulenmaterial wurde mit 400 ml Wasser gewaschen und die Steroide mit 200 ml Methanol eluiert. Anschließend wurden Fettsäuren an DEAP-LH-20 und Cholesterin an Lipidex mit dem oben angegebenen Laufmittel entfernt.
Die Steroide wurden dann an Sephadex-LH-20 (8 g) mit dem Laufmittelsystem n-Heptan:Chloroform 1 : 1 bei einer Durch-

flußrate von 4 ml/h von Glyceriden abgetrennt. Die ersten 8 ml enthielten einen großen Teil der Begleitstoffe und die nächsten 200 ml die Steroide, die dann an Kieselgel gereinigt wurden.

3.2 Aufarbeitung B

Die freien Steroide wurden aus 250 ml Plasma durch dreimalige Extraktion mit je 50 ml Ether gewonnen und von Begleitstoffen nach dem oben angegebenen Verfahren abgetrennt.

3.3 Aufarbeitung C

250 ml Plasma wurden mit 10-fachem Überschuß an physiologischer Kochsalzlösung, die 10 % Methanol enthielt, versetzt[159]. Es entstand eine leichte Trübung, aber es fiel noch kein Eiweiß aus. Die Steroide wurden bei Raumtemperatur und einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/h über eine XAD-4-Säule (200 g) gegeben und weiter nach Aufarbeitung A isoliert.

C. Isolierung der Steroide aus Liquor cerebrospinalis

1. Aufarbeitung I

310 ml Liquor wurden auf das Doppelte mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt (Liquor enthält wesentlich weniger Proteine als Plasma), bei 64°C zur Spaltung der Protein-Steroidbindung 12 Stunden belassen und bei Raumtemperatur mit einer Durchflußrate von 10 ml/h über eine XAD-4-Säule (300 g) gegeben. Die mit Methanol eluierte und eingedampfte organische Phase wurde an Sephadex-LH-20 in freie Steroide

und Glucuronide (0 - 20 ml) und in Sulfate (21 - 500 ml) getrennt. Die Sulfate wurden wie die Blutsteroidsulfate weiter aufgearbeitet.
Die erste Sephadexfraktion wurde nach Entfernen des Lösungsmittels mit 50 ml Wasser aufgenommen und mit 3 x 50 ml Ether extrahiert. Die Etherphase enthielt die freien Steroide. Die Glucuronide und freien Steroide wurden, wie beschrieben, weiter isoliert.

2. Aufarbeitung II

650 ml Liquor wurden mit 3 x 100 ml Ether ausgeschüttelt. Die Etherphase (freie Steroide) und die wäßrige Phase (Konjugate) wurden nach den bekannten Verfahren weiter aufgearbeitet.

D. Herstellung der Trimethylsilylether

Die Proben wurden in Methanol aufgenommen, in kleine Reaktionsröhrchen gebracht und nach Entfernen des Lösungsmittels mit 3 µl MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluor-acetamid) versetzt. Die Röhrchen wurden zugeschmolzen und 24 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Das Reaktionsgemisch wurde ohne weitere Aufarbeitung in der Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer untersucht.
Innerhalb von drei Tagen muß die Probe analysiert werden, da sonst merkliche Enolisierung der Steroidketone eintritt und das Ergebnis verfälscht. Nach einem Tag beträgt bespiels-

weise die Enolisierung des Dehydroepiandrosterons ungefähr 5 %, die anhand der Absolutintensitäten der beiden Massenspektren, die in einem Lauf mit der Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kombination aufgenommen wurden, abgeschätzt werden konnte.

Nach einer Woche ist das gesamte Dehydroepiandrosteron enolisiert. Die Enolisierungszeit der Steroidketone ist allerdings sehr unterschiedlich: 3-Keto-Δ^4-Steroide enolisieren beispielsweise erheblich schneller als das Dehydroepiandrosteron. Die Enolisierung verläuft ebenfalls schneller, wenn Laugen und Säuren nicht quantitativ abgetrennt wurden: Im Trennungsgang wurde Eisessig im Acetatpuffersystem zur enzymatischen Verseifung verwendet. Restlicher Eisessig kann zwar im Vakuum entfernt werden, nicht aber, wenn das Steroidgemisch im Reaktionsröhrchen unter Stickstoff eingedampft wird. In diesen Fällen wurde eine sofortige Enolisierung des Dehydroepiandrosterons beobachtet.

E. Trennungsversuche mit Testgemischen an Säulen

1. Sephadex-LH-20 A

53 mg Cholesterin und 8 mg Dehydroepiandrosteron-sulfat wurden an einer Sephadex-LH-20-Säule (0,5 cm Durchmesser, 40 cm Länge, 4 g) mit dem Laufmittelsystem Chloroform: Methanol 1 : 1, dem 0,01 Mol NaCl zugesetzt war, bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 4 ml/h getrennt. 15 Fraktionen (jeweils 4 ml) wurden aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde

eingedampft, der Rückstand ausgewogen und die Auftrennung der beiden Steroide dünnschicht- und gaschromatographisch bestimmt. Da das NaCl mitgewogen wurde, mußte zur quantitativen Bestimmung der Mittelwert des NaCl-Anteils , der durch Blindwerte ermittelt werden konnte, wieder abgezogen werden.

2. DEAP-LH-20

100 mg Cholesterin, 6 mg Dehydroepiandrosteron und 100 mg Palmitinsäure wurden an einer DEAP-LH-20-Säule (1 cm Durchmesser, 40 cm Länge, 8 g) getrennt. 25 Fraktionen (jeweils 4 ml) wurden genommen, Laufmittel: Methanol : Chloroform : Wasser 9 : 2 : 1, Durchlaufgeschwindigkeit: 4 ml/h.

3. Lipidex^{R}-5000

Der Test wurde mit 86 mg Cholesterin und 5,5 mg Dehydroepiandrosteron an einer Lipidexsäule (0,5 cm Durchmesser, 30 cm Länge, 5 g) bei einer Laufgeschwindigkeit von 6 ml/h durchgeführt. 30 Fraktionen wurden aufgefangen (jeweils 4 ml), Laufmittel: Methanol : Chloroform : Wasser 9 : 2 : 1.

4. Sephadex-LH-20 B

5 mg Dehydroepiandrosteron und 5 mg 11ß-Progesteron wurden an Sephadex-LH-20 (Säule: 1 cm Durchmesser, 50 cm Länge, 8 g) mit dem Laufmittel n-Heptan : Chloroform 1 : 1 fraktioniert,

Durchlaufgeschwindigkeit 8 ml/h, 60 ml wurden in 4 ml-Fraktionen aufgefangen. Zur Aufnahme der Elutionskurve wurden dann 5 mg Dehydroepiandrosteron unter denselben Bedingungen eingesetzt.

F. Überprüfen der Aufarbeitungsverfahren mit 7-^{3}H Dehydroepiandrosteron-ammoniumsulfat und 7-^{3}H Dehydroepiandrosteron mit der Tracer-Methode

Zu je 100 ml Plasma wurde 0,05 µC [7-^{3}H] Dehydroepiandrosteron-ammoniumsulfat (entsprechend 111 400 Ipm) und 30 µg unmarkiertes Dehydroepiandrosteronsulfat hinzugefügt. Dreimal wurde das Aufarbeitungsverfahren mit dem radioaktiven Steroid durchgeführt. Nach jedem Trennschritt wurde die restliche Radioaktivität mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt: Ein Aliquot der radioaktiven Probe wurde abgenommen, in ein Meßröhrchen aus kaliumfreiem Glas gebracht, unter Stickstoff bei Raumtemperatur eingedampft und mit 20 ml Szintillatorlösung aufgefüllt. Für jeden Aufarbeitungsschritt wurden drei Meßwerte bestimmt, die gemittelt wurden.
Der Trennungsgang der freien Steroide wurde in derselben Weise mit 0,016 µC [7-^{3}H] Dehydroepiandrosteron (entsprechend 40 000 Ipm) durchgeführt.

Szintillatorlösung (für wässrige Proben)

1000 ml Toluol
600 ml Ethanol
5 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO)

50 mg p-Bis- 2-(5-phenyl-oxazolyl) benzol (POPOP)

G. Herstellung von 3ß,17α,20α-Trihydroxy-5α-pregnan[160]

1 mg 3ß,17α,20α-Trihydroxy-5-pregnen wurde in 1 ml Methanol gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Rühren mit Wasserstoff hydriert. Als Katalysator wurde 1 mg Platin-IV-oxid verwendet. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung vom Katalysator abfiltriert. Methanol konnte im Stickstoffstrom entfernt werden. Der TMS-Ether des Reaktionsproduktes wurde in der Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kombination analysiert und zur Bestimmung des Retentionsindex verwendet.

H. Bestimmung der Retentionsindices[161]

Die Retentionsindices wurden an Glaskapillarsäulen, die nach statischer Methode mit SE-30 beschichtet waren, gemessen. Als Bezugskohlenwasserstoffe dienten n-$C_{20}H_{42}$, n-$C_{22}H_{46}$, n-$C_{24}H_{50}$ und n-$C_{32}H_{66}$. Bei temperaturprogrammiertem Betrieb und der Verwendung von n-$C_{24}H_{50}$ und n-$C_{32}H_{66}$ als Bezugssubstanzen mußte ein Fehler von 0,05 % bei graphischer Auswertung der Retentionsindices angenommen werden.
Die Retentionszeiten der n-Alkanhomologen steigen bei Temperaturprogrammierung nämlich nicht mehr linear an, sondern werden mit zunehmender Zahl der Kohlenstoffatome kürzer. Abb. 63 zeigt den Verlauf dieser Kurve.

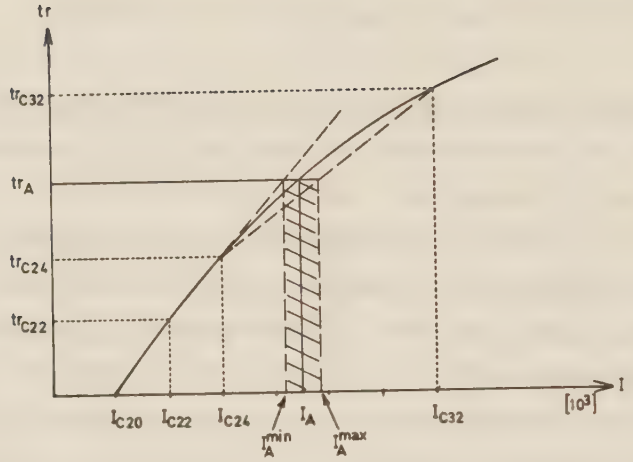


Abb.:63

Um die Retentionsindices von Referenzsteroiden und Blutsteroiden miteinander vergleichen zu können, wurde durch die Kurve eine Gerade gelegt, deren Schnittpunkte die Werte der Kohlenwasserstoffe $C_{24}H_{50}$ und $C_{32}H_{66}$ waren. So konnten die "relativen" Retentionsindices, die I_A^{Max}-Werte ermittelt werden.

Da die Messungen von Referenzsteroiden und Blutsteroiden in der gleichen Weise durchgeführt wurden, waren beide Retentionsindices mit dem gleichen systematischen Fehler behaftet und konnten miteinander verglichen werden.

In Tabelle 17 und im theoretischen Teil in Tabelle 5 und Tabelle 6 sind Retentionsindices von Referenzsteroiden zusammengestellt.

Tabelle 18

Retentionsindices von Steroidtrimethylsilykethern

Steroid	Molgewichte der TMS-Ether	Retentions-index SE 30
20α-Hydroxy-4-pregnen-3-on	388	2900
20α-Hydroxy-5ß-pregnan-3-on	390	2794
20α-Hydroxy-5α-pregnan-3-on	390	2818
11α-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion	402	2982
3α,17ß-Dihydroxy-5-androsten	434	2590
3ß,17ß-Dihydroxy-5α-androstan	436	2638
3ß,16α-Dihydroxy-5-androsten-17-on	448	2764
3ß,20α-Dihydroxy-5-pregnen	462	2862
3ß,17α,20α-Trihydroxy-5-pregnen	478	3020
3ß,17α,20α-Trihydroxy-5α-pregnan	480	3012
3ß,16α, 17ß-Trihydroxy-5-androsten	522	2880
3ß,16ß,17ß-Trihydroxy-5-androsten	522	2908
3ß,16α,20α-Trihydroxy-5-pregnen	550	3017

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. D. Henneberg, U. Henrichs, G. Schomburg, J. Chromatogr. 112, 343 (1975)
2. N. Neuner-Jehle, F. Etzweiler, G. Zarske, Chromatographia 6, 211 (1973)
3. T. L. Berthou, P. Picart, L. G. Bardou, H. H. Flock, J. Chromatogr. Science 12, 662 (1974)
4. M. Ende, G. Spiteller, Monatsh. Chemie 102, 929 (1971)
5. H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann, G. Spiteller, Chem. Ber. 103, 1497 (1970)
6. M. Spiteller-Friedmann, G. Spiteller, Fortschr. chem. Forschung 12, 440 (1969)
7. F.-J. Hammerschmidt, G. Spiteller, Tetrahedron 29, 3393 (1973)
8. E. Zietz, G. Spiteller, Tetrahedron 30, 585 (1974)
9. B. Stock, G. Spiteller, Org. Mass Spektrom. 9, 888 (1974)
10. H. Obermann, G. Spiteller, G. A. Hoyer, Chem. Ber. 106, 3506 (1973)
11. H. Ludwig, H. Obermann, G. Spiteller, Chem. Ber. 107, 2409 (1974)
12. H. Obermann, G. Spiteller, Chem. Ber. 108, 1093 (1975)
13. J. Reiner, G. Spiteller, Monatsh. Chemie, 106, 1415 (1975)
14. H. Ludwig, J. Reiner, G. Spiteller, Publikation im Druck
15. H. Luftmann, Dissertation, Göttingen (1974)
16. Geigy, Wissenschaftl. Tabellen, 7. Auflage (1968)
17. T. Laatikainen, R. Vihko, J. Steroid Biochem. 2, 173 (1971)
18. G. E. Abraham, Anal. Letters 5, 915 (1972)
19. O. Jänne, R. Vihko, J. Sjövall, K. Sjövall, Clin. Chim. Acta 23, 405 (1969)
20. K. Sjövall, Ann. Clin. Res. 2, 393 (1970)
21. K. Sjövall, Ann. Clin. Res. 2, 409 (1970)

22. J. Sjövall, K. Sjövall, Ann. Clin. Res. 2, 321 (1970)

23. P. Karlson, "Kurzes Lehrbuch der Biochemie", Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

24. W. F. Ganong, "Medizinische Physiologie", Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1972)

25. H. H. Wotiz, G. Charransol, J. N. Smith, Steroids 10, 127 (1967)

26. S. D. Frasier, R. Horton, Steroids 8, 777 (1966)

27. H. H. Simmer, W. J. Dignam, W. E. Easterling, M. V. Frankland, F. Naftalin, Steroids 8, 179 (1966)

28. W. E. Easterling, H. H. Simmer, W. J. Dignam, M. V. Frankland, F. Naftalin, Steroids 8, 157 (1966)

29. G. W. Oertel, Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 336, 236 (1969)

30. J. M. Saez, S. Saez, C.G. Migeon, Steroids 9, 1 (1967)

31. T. Yoshimi, M. B. Lipsett, Steroids 11, 527 (1968)

32. D. Exley, Biochem. J. 107, 285 (1968)

33. C. H. L. Shackleton, F. L. Mitchell, Steroids 10, 359 (1967)

34. T. Feher, Mikrochem. Ichnoanal. Acta 1965, 105

35. J. Sjövall, R. Vihko, Steroids 6, 597 (1965)

36. T. Kato, R. Horton, Steroids 12, 631 (1968)

37. T. Cronholm, J. Sjövall, Eur. J. Biochem. 2, 375 (1967)

38. M. Novotny, M. P. Maskarinec, A. T. G. Steverink, R. Farlow, Anal. Chem. 48, 468 (1976)

39. F. A. Fitzpatrick, S. Siggia, J. Dingman, Anal. Letters 4, 2211 (1972)

40. J. T. Oliver, T. G. Peron, Steroids 4, 351 (1964)

41. B. Runnebaum, H. van der Molen, Steroids 6 Suppl. II, 189 (1965)

42. G. Telegdy, E. Endröszi, Steroids 2, 119 (1963)

43. H. W. Margraf, C. O. Margraf, T. E. Weichselbaum, Steroids 2, 155 (1963)

44. R. Guerro, B. M. Landgren, R. Montiel, Z. Lehan, E. Diczfalusy, Contraception 11, 169 (1975)

45. J. E. Buster, G. E. Abraham, Anal. Letters 5, 487 (1972)

46. A. W. Steinbeck, Hum. Reprod. Physiol. 752 (1972), R. B. Blackwell, Edition Shearman, Oxford

47. T. Laatikainen, J. Peltonen, P. Nylander Steroids 21, 347 (1973)

48. O. Jänne, L. Viinikka, R. Vihko, Endocrinol. 4, 39 (1975)

49. L. Viinikka, O. Jänne, J. Perheentupa, R. Vihko, Clin. Chim. Acta 48, 359 (1973)

50. J. Sjövall, K. Sjövall, R. Vihko, Steroids 11, 703 (1968)

51. J. Sjövall, K. Sjövall, Steroids 11, 359 (1968)

52. J. Sjövall, R. Vihko, Steroids 7, 447 (1966)

53. R. Vihko, O. Jänne, T. Lukkainen, Acta Endocrinol. Suppl. 119, (1967)

54. R. Vihko, O. Jänne in R. Scholler: "Gaschromatography of Hormone Steroids", Proceedings of the Round Table Conference Paris (1967)

55. M. Axelson, J. Sjövall, J. Steroid Biochem. 5, 1 (1974)

56. G. W. Oertel, P. Brühl, Z. klin. Chem. 4, 66 (1966)

57. A. O. Lurie, J. B. Weiss, Nature 215, 1178 (1967)

58. D. N. Baron, D. Abelson, Nature 173, 174 (1954)

59. E. Bailey in: "Memoirs of the Society for Endocrinology", Nr. 16, 191, Edition: J. K. Grant (1967)

60. E. C. Horning, W. J. A. Van den Heuvel, Chim. Anal. 48, 79 (1966)

61. T. Uete, M. Wasa, A. Shimogami, Metab. Clin. Exp. 16, 608 (1967)

62. A. T. Wan, C. H. Charter, Clin. Chim. Acta 13, 546 (1966)

63. G. v. Unruh, Dissertation, Göttingen (1972)

64. B. W. L. Brooksbank, Biochem. J. 106, 11 (1968)

65. M. A. Rivarola, C. J. Migeon, Steroids 7, 103 (1965)

66. F. Dray, I. Moszowicz, M. Ledru, Steroids 10, 501 (1967)

67. J. Sjövall, R. Vihko, Acta Endocrinol. 57, 247 (1968)

68. V. K. Ganjam, B. E. P. Murphy, T. H. Chan, P. A. Currie, J. Steroid Biochem. 2, 155 (1971)

69) G. W. Oertel, K. B. Eik-Nes, Arch. Biochem. Biophysics 92, 150 (1961)

70. T. Cronholm, J. Sjövall, Biochem. Biophys. Acta 152, 233 (1968)

71. B. T. Rudd, G. Holder, Clin. Chim. Acta 47, 261 (1973)

72. H. Gottfried, Steroids 3, 219 (1964)

73. D. Gracer, D. R. Idler, Can. J. Biochem. Physiol. 39, 1585 (1961)

74. J. Zander, A. M. Münstermann, B. Runnebaum, Klin. Wochenschr. 40, 436 (1962)

75. J. Guillon, J. Colas, R. Tricherau, G. Delumeau, E. E. Beaulieu, Ann. Endocrin. (Paris) 22, 331 (1961)

76. L. Starka, R. Hampe, Naturwissensch. 51, 164 (1964)

77. W. Streib, W. Teller, H. Pelzer, Biochem. Biophys. Acta 31, 591 (1959)

78. G. R. Gaertz, O. C. Crepy, O. E. Judas, Biochemie 56, 347 (1974)

79. G. W. Oertel, Fortschr. Med. 80, 291 (1962)

80. K. Savard, Ciba Found. Colloqu. Endocrinol. 11, 252 (1957)

81. W. A. Eberlein, J. Clin. Endocrinol. Metab. 25, 1101 (1965)

82. G. W. Oertel, K. B. Eik-Nes, Endocrinology 68, 313 (1962)

83. J. Zander, T. Thyssen, A. M. Münstermann, J. Clin. Endocrinol. Metab. 22, 861 (1962)

84. G. L. Forell, E. W. Rauschkolb, P. C. Royce, H. Hirschmann, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 87, 587 (1954)

85. J. Sjövall, K. Sjövall, Steroids 12, 359 (1968)

86. B. T. Rudd, S. Black, Clin. Chim. Acta 20, 81 (1968)

87. G. W. Kittinger, N. B. Beamer, Steroids 12, 275 (1968)

88. G. L. Forell, B. Lamms, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 84, 89 (1953)

89. P. Mason, R. Fraser, J. Endocrinol. 64, 277 (1975)

90. H. Wyman, I. F. Sommerville, Steroids 12, 63 (1968)

91. S. Miyabo, L. Kornel, J. Steroid Biochem. 5, 233 (1974)

92. M. B. R. Gare, D. M. Baron, J. Endocrinol. 21, 303 (1960)

93. D. R. Idler, P. J. Schmidt, A. P. Ronald, Can. J. Biochem. Physiol. 40, 549 (1962)

94. E. Melville, R. W. Kelly, F. L. Mitchell, Acta Endocrinol. 67, 531 (1971)

95. H. Gerdes, W. Teller, Acta Endocrinol. 59, 203 (1968)

96. E. Bailey, Mem. Soc. Endocrinol. 16, 183 (1967)

97. L. Kornel, J. T. Moore, J. Noyes, J. Clin. Endocrinol. Metab. 30, 40 (1970)

98. W. Hölzel, Dissertation, Göttingen (1971)

99. G. v. Unruh, G. Remberg, G. Spiteller, Chem. Ber. 104, 2071 (1971)

100. G. Remberg, H. Luftmann, G. v. Unruh, G. Spiteller, Tetrahedron 27, 5853 (1971)

101. M. Matsui, M. Hakozaki, Y. Kinuyama, J. Chromatogr. 115, 625 (1975)

102. H. L. Bradlow, Steroids 11, 265 (1968)

103. S. Burstein, S. Lieberman, J. Biol. Chem. 233, 331 (1958)

104. C. G. Beling, Acta Endocrinol. Suppl. 79, 46 (1963)

105. U. Hoffmann, H. Maass, B. P. Lisboa, Eur. J. Biochem. 59, 305 (1975)

106. J. P. Thenot, E. C. Horning, Anal. Letters 5, 21 (1972)

107. K. B. Eik-Nes, E. C. Horning: "Gas Phase Chromatography of Steroids", Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York(196

108. J. A. Luyen, G. A. F. M. Rutten, J. Chromatogr. 91, 393 (1974)

109. R. Vihko, Acta Endocrinol. Suppl. 109, 1 (1966)

110. M. Ende, Dissertation, Göttingen (1974)

111. I. Björkheim, J. A. Gustafsson, S. A. Gustafsson, Eur. J. Biochem. 16, 557 (1970)

112. C. W. Brooks, E. C. Horning, J. S. Young, Lipids 3, 391 (1968)

113. O. Jänne, T. Laatikainen, Y. Vaino, R. Vihko, Steroids 13, 121 (1969)

114. T. Laatikainen, R. Vihko, Eur. J. Biochem. 10, 165 (1969)

115. P. Eneroth, K. Hellström, R. Ryhage, Steroids 6, 707 (1965)

116. J. Diekman, C. Djerassi, J. Org. Chem. 32, 1005 (1967)

117. H. Schildknecht, H. Birringer, Z. Naturforschung 24 B, 1529 (1969)

118. C. Djerassi, J. M. Wilson, H. Budzikiewicz, J. W. Chamberlain, J. Am. Chem. Soc. 84, 4544 (1962)

119. C. W. Brooks, D. J. Harvey, B. S. Middleditch, P. Vouros, Org. Mass Spektrom. 7, 925 (1973)

120. H. Eriksson, J. A. Gustafsson, J. Sjövall, Eur. J. Biochem. 6, 219 (1968)

121. C. W. Brooks, J. Org. Chem. 37, 3365 (1972)

122. P. Vouros, D. J. Harvey, Org. Mass Spektrom. 6, 953 (1972)

123. J. A. Gustafsson, B. P. Lisboa, Eur. J. Biochem. 16, 475 (1970)

124. O. Jänne, R. Vihko, Steroids 14, 235 (1967)

125. C. H. L. Shackleton, J. A. Gustafsson, J. Sjövall, Steroids 17, 265 (1971)

126. T. Laatikainen, D. Peltokallio, R. Vihko, Steroids 12, 407 (1968)

127. P. Vouros, J. Org. Chem. 38, 3557 (1973)

128. J. A. Gustafsson, C. H. L. Shackleton, J. Sjövall, Eur. J. Biochem. 10, 302 (1969)

129. T. Laatikainen, Eur. J. Biochem. 14, 372 (1970)

130. A. M. Kirkien-Konsasiewiecz, R. M. Moriarty, A. G. Loudon, P. M. Cardnell, Org. Mass Spektrom. 1, 567 (1968)

131, S. Sloan, P. J. Harvey, P. Vouros, Org. Mass.Spektrom. 5, 789 (1971)

132. H. Egger, G. Spiteller, Monatsh. Chemie 97, 579 (1966)

133. T. Laatikainen, Steroids 15, 139 (1970)

134. H. Grote, G. Spiteller, Publikation in Vorbereitung

135. C. H. L. Shackleton, J. A. Gustafsson, Steroids 18, 175 (1971)

136. H. Grote, Diplomarbeit, Göttingen (1975)

137. H. Grote, mündliche Mitteilung

138. Göttinger Spektrenkartei

139. C. R. Narayanon, A. K. Lala, Org. Mass Spektrom. 6, 119 (1972)

140. B. P. Lisboa, J. A. Gustafsson, Eur. J. Biochem. 9, 503 (1969)

141. O. Jänne, R. Vihko, J. Steroid Biochem. 1, 177 (1970)

142. K. Biemann: "Mass Spektrometry", McGraw Hill (1962)

143. L. Starka, Acta Endocrinol. 59, 231 (1968)

144. L. Starka, E. Doellefeld, H. Breuer, Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 348, 293 (1967)

145. L. Cedard, B. Fillmann, R. Knuppen, B. P. Lisboa, H. Breuer Z. Physiol. Chem. 338, 89 (1969)

146. F. Imre, J. Toth, J. Miklos, Kiserl. Ovostud. 25, 324 (197

147. J. M. Saez, B. Loras, A. M. Morera, J. Bertrand, J. Steroi Biochem. 1, 355 (1970)

148. J. A. Gustafsson, B. P. Lisboa, J. Sjövall, Eur. J. Biochem. 6, 317 (1968)

149. J. A. Gustafsson, B. P. Lisboa, Steroids 11, 555 (1968)

150. B. E. Gustafsson, J. A. Gustafsson, J. Sjövall, Eur. J. Biochem. 4, 568 (1968)

151. B. P. Lisboa, J. A. Gustafsson, Steroids 12, 249 (1969)

152. E. M. Chambaz, J. Steroid Biochem. 3, 741 (1974)

153. L. Aringer, P. Eneroth, J. A. Gustafsson, Steroids 17, 377 (1971)

154. R. Blomstrand, Arkiv för Kemi 30, 233 (1968)

155. E. Boehle, E. Harmuth, M. Rajewsky, Z. klin. Chemie 2, 105 (1964)

156. L. Petersen, Anal. Chem. 34, 1781 (1962)

157. L. Tökés, C. Djerassi, Steroids 6, 493 (1965)

158. J. Bouche, M. Verzele, J. Chromatogr. 6, 501 (1968)

159. B. P. Lisboa, mündliche Mitteilung

160. M. J. T. Robinson, Tetrahedron 1, 49 (1957)

161. J. Reiner, Diplomarbeit, Göttingen 1974

D A N K

Den Herren Dr. G. Remberg, Dr. M. Ende, Dr. W. Baumgartner (LKB-Produkter, Bromma) und Dipl.-Chem. J. Reiner, die einen reibungslosen Ablauf des meßtechnischen Teiles meiner Arbeit - Aufnahme der Glaskapillargaschromatogramme und der Massenspektren - ermöglichten, bin ich zu großem Dank verpflichtet. Herrn Dr. J. Friedrich-Fiechtl danke ich für die Szintillationsmessungen.

Bei Herrn Dr. B.P. Lisboa bedanke ich mich für den Aufenthalt in Hamburg. Während dieser Zeit konnte ich in den Labors der Universitätsfrauenklinik Hamburg einige Plasmaaufarbeitungen durchführen.

Herr Dipl.-Chem. H.J. Egger stellte mir Säulenmaterial, Herr Dipl.-Chem. H. Grote Referenzsteroide und Herr Dr. K. Eickhoff Liquorproben zur Verfügung. Herr Dr. W. Grossmann half mir ebenfalls bei der Beschaffung von Liquorproben. Den Angestellten der Labors der Nervenkliniken und der Blutbank der Universität Göttingen danke ich für die bereitwillige Unterstützung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich meinen Kollegen für ihre freundschaftliche Zusammenarbeit, Herrn A. Kohl für seine Mitarbeit und Frau Schubert, die mit großer Sorgfalt die Arbeit schrieb.

L E B E N S L A U F

Am 30. 8. 1947 wurde ich als älteste Tochter des Fleischermeisters Werner Ludwig und seiner Ehefrau Frieda, geb. Schnake, in Göttingen geboren. 4 Jahre besuchte ich die Volksschule in Dransfeld und 9 Jahre das Gymnasium für Mädchen (heutiges Hainberggymnasium) in Göttingen und bestand am 19. 9. 1966 das Abitur. Ich schrieb mich an der Georg-August-Universität in Göttingen für das Studienfach Chemie ein und unterzog mich am 2. 2. 1971 der Diplomchemiker-Vorprüfung. Im Arbeitskreis von Prof. Dr. U. Schöllkopf fertigte ich unter der Leitung von Dr. F. Gerhart meine Diplomarbeit an und legte am 13. 12. 1972 die Diplomchemiker-Hauptprüfung ab. Seit Februar 1973 arbeite ich in der Abteilung von Prof. Dr. G. Spiteller an meiner Dissertation.